

SÉRIE A, N° 1973

N° D'ORDRE : 2840

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JOSEPH TABONE

Né le 19 juillet 1911, à Tunis (Tunisie)

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DES RADICAUX ACÉTYLES LIÉS AUX PROTÉIDES SÉRIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **Juillet 1941** devant la Commission d'Examen

MM. JAVILLIER. . .	Président.
CABANNES. . .	} Examinateurs.
AUBEL.	

PARIS

ANC^{NE} IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

—
1941

SÉRIE A, N° 1973

N° D'ORDRE : 2840

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JOSEPH TABONE

Né le 19 juillet 1911, à Tunis (Tunisie)

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DES RADICAUX ACÉTYLES LIÉS AUX PROTÉIDES SÉRIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **Juillet 1941** devant la Commission d'Examen.

MM. JAVILLIER. . . . *Président.*

CABANNES. . . . } *Examineurs.*

AUBEL. . . . }

PARIS

ANC^{NE} IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

1941

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. M. MOLLIARD.

Doyen. C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires.</i>	H. LEBESGUE.	DANGEARD	G. BERTRAND.	BOHN.
	Émile PICARD.	LESPIEAU.	Ch. FABRY.	RABAUD.
	Léon BRILLOUIN.	VESSIoT.	Léon BERTRAND.	CAULLERY.
	PÉCHARD.	PORTIER.	WINTREBERT.	J. PERRIN.
	FREUNDLER.	MOLLIARD.	DUBOSQ.	E. CARTAN.
	AUGER.	LAPICQUE.		

PROFESSEURS

Émile BOREL.	T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	PRENANT.	T	Anatomie et histologie comparées.
A. COTTON.	T	Recherches physiques.	VILLEY		Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	COMBES	T	Physiologie végétale.
Charles PÉREZ. . . .	T	Zoologie.	GARNIER.	T	Application de l'Analyse à la Géométrie.
M. GUICHARD. . . .	T	Analyse et mesures chimiques.	PÈRÈS.		Mécanique théorique des fluides.
Paul MONTEL. . . .	T	Théorie des fonctions.	HACKSPILL.	T	Chimie minérale.
L. BLARINGHEM. . .	T	Botanique.	TOUSSAINT.		Technique Aéronautique.
G. JULIA.	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	M. CURIE		Physique (P. C. B.).
G. MAUGUIN	T	Minéralogie.	G. RIBAUD.	T	Hautes températures.
A. DENJOY.	T	Géométrie supérieure.	CHAZY.	T	Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD.	T	Géographie physique et géologie dynamique.	GAULT.		Chimie (P. C. B.).
G. BRUHAT.	T	Physique théorique et physique céleste.	CROZE.		Recherches physiques.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	DUPONT.	T	Théories chimiques.
A. DEBIERNE	T	Physique générale et Radioactivité.	LANQUINE	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. DUFOUR.	T	Physique (P. C. B.).	VALIRON.		Mathématiques générales.
L. DUNOYER		Optique appliquée.	BARRABÉ.		Géologie structurale et géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND. .	T	Botanique.	MILLOT		Biologie animale (P. C. B.).
M. JAVILLIER. . . .	T	Chimie biologique.	F. PERRIN.		Théories physiques.
Henri VILLAT . . .	T	Mécanique des fluides et applications.	VAVON.		Chimie organique.
Ch. JACOB.	T	Géologie.	G. DARMOIS		Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
P. PASCAL.	T	Chimie générale.	CHATTON.	T	Biologie maritime.
M. FRÉCHET	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	AUBEL.		Chimie biologique.
E. ESCLANGON . . .	T	Astronomie.	Jacques BOURCART.		Géographie physique et Géologie dynamique.
M ^{me} RAMART-LUCAS.	T	Chimie organique.	M ^{me} JOLIOT-CURIE. .		Physique générale et Radioactivité.
H. BÉGHIN.	T	Mécanique physique et expérimentale.	PLANTEFOL.		Biologie végétale (P. C. B.).
FOCH	T	Mécanique expérimentale des fluides.	CABANNÈS		Enseignement de Physique.
PAUTHENIER		Physique (P. C. B.).	GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
De BROGLIE	T	Théories physiques.	PRÉVOST.		Chimie (P. C. B.).
CHRÉTIEN		Optique appliquée.	BOULIGANT.		Mathématiques.
LABROUSTE.		Physique du Globe.	CHAUBRON.		Chimie (P. C. B.).

Secrétaire. A. PACAUD.

Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

Je dédie ce travail.

ÉTUDE DES RADICAUX ACÉTYLES

LIÉS AUX PROTÉIDES SÉRIQUES

INTRODUCTION

Les radicaux acétyles liés aux protéides sériques, dont nous avons signalé l'existence dans une publication précédente (1), peuvent jouer un rôle qui, bien que non encore élucidé, peut être important.

La chimie biologique nous offre, en effet, de nombreux exemples de substances qui doivent leurs propriétés aux groupements acétylés de leurs molécules. C'est ainsi que la choline voit son action sur la pression sanguine croître de 1 à 40.000 du fait de la fixation d'un radical acétyle sur sa molécule (2). Nous rappellerons aussi l'exemple des polysides du pneumocoque et des haptènes de Forssman. On sait que Avery et Goebel (3) ont pu extraire du pneumocoque type I un glucide acétylé. Ce glucide absorbe complètement tous les anticorps spécifiques de l'antisérum du type homologue, immunise la souris contre l'infection à pneumocoque type I et provoque chez cet animal du purpura. Ces différentes propriétés biologiques sont en relation étroite avec la présence des groupements acétylés, puisqu'on ne les retrouve plus dans le glucide

(1) SANDOR et TABONE. *C. R. Ac. Sc.*, **207**, 1938, p. 601.

(2) HUNT, *Journ. Pharm. and exp. Therap.*, **7**, 1915, p. 305.

(3) AVERY et GOEBEL. *Journ. of exp. Med.*, **58** (2), 1933, p. 731.

désacétylé. Plus récemment, Witebsky, Netter et Sobotka (4) ont montré qu'il existe une relation sérologique entre le polyoside acétylé du pneumocoque type I et la substance spécifique A des groupes sanguins humains. Ils ont, de plus, précisé que les radicaux acétyles liés au polyoside du pneumocoque sont indispensables à son activité comme haptène A. Au surplus, il semble bien établi que le pouvoir hapténique des substances de Forssman est dû, dans tous les cas, aux radicaux acétyles fixés sur leurs molécules. En effet, Freudenberg (5) a observé sur les haptènes de Forssman, extraits de l'urine des Hommes appartenant aux groupes sanguins A et AB et des organes du Porc, les mêmes faits que ceux observés par les auteurs précédents à propos de l'haptène extrait du pneumocoque. Il a démontré de plus qu'on peut régénérer le pouvoir hapténique des préparations désacétylées en les réacétylant par le cétène.

Les dérivés acétylés peuvent jouer un rôle bien différent de celui que nous venons de considérer. On sait que certains acides aminés étrangers à l'organisme sont éliminés à l'état acétylé par les urines et que ce fait, et d'autres encore, ont permis à du Vigneaud et Irish (6) de penser que, normalement, au cours de leurs synthèses, tous les acides aminés doivent passer par le stade acétylé. D'après cette hypothèse, le radical acétyle interviendrait donc dans la synthèse biologique des protéides.

Les faits et les hypothèses que nous venons de rappeler nous ont conduit à penser que la preuve que nous avons donnée de l'existence dans le sérum de cheval d'acide acétique fixé sur les protéides était digne d'attention et qu'il était d'un réel intérêt de préciser le fait observé et de tenter d'élucider le mode de liaison des radicaux acétyles avec la molécule protéidique.

*
* *

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail nous tenons

(4) WITEBSKY, NETTER et SOBOTKA. *Journ. of exp. Med.*, **61**, 1935, p. 703.

(5) FREUDENBERG. *Ann. der Chem.*, **518**, 1935, p. 97 et *Naturwiss.*, **24**, 1936, p. 522.

(6) DU VIGNEAUD et IRISH. *J. of biol. Chem.*, **122**, 1937, p. 39.

à remercier M. le D^r Marchoux, président de la Fondation Roux, MM. le D^r Martin, Ramon et Tréfouël, directeurs de l'Institut Pasteur et à leur témoigner notre gratitude pour la bienveillance qu'ils nous ont toujours montrée.

A M. le professeur Machebœuf qui fut notre premier maître à l'Institut Pasteur et à M. le D^r Berthelot qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire, nous adressons l'expression de notre reconnaissance.

A M. Sandor, assistant à l'Institut Pasteur, nous adressons nos bien vifs remerciements pour les conseils avisés qu'il nous a donnés et qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

HISTORIQUE

RÉPARTITION DES RADICAUX ACÉTYLES DANS LA MATIÈRE VIVANTE

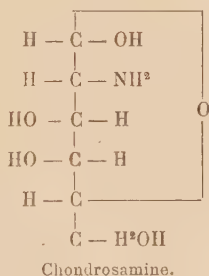
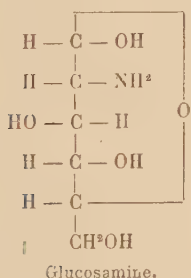
On serait tenté de croire, d'après l'hypothèse de du Vigneaud et Irish que le radical acétyle est répandu d'une façon universelle dans l'organisme du fait de la formation dans les tissus de dérivés acétylés des acides aminés. Ces auteurs pensent cependant que la vitesse d'hydrolyse de ces dérivés est très grande de sorte que leur concentration dans les tissus doit être extrêmement faible. En fait, leur présence n'a été vérifiée que dans quelques cas particuliers. Par contre, il existe dans l'organisme des substances acétylées qui s'y trouvent à des concentrations plus ou moins importantes, c'est le cas de certains osides.

ETUDE DES OSES ACÉTYLÉS.

Un grand nombre de polyosides se trouvent à l'état acétylé dans la matière vivante. Il en est ainsi pour la chitine qui forme les tissus de soutien chez les Arthropodes et de nombreux Champignons et Lichens. Ce polyoside donne par hydrolyse des quantités équivalentes de glucosamine et d'acide acétique. Il semble que sa structure soit analogue à celle de la cellulose ; l'acétylglucosamine tenant dans la chitine la place que tient le glucose dans la cellulose. Il en est ainsi, aussi, comme nous venons de le voir, pour un certain nombre de polyosides qui interviennent dans les réactions immunologiques : haptène polyosidique des pneumocoques, polyoside

du bacille de Shiga, substance spécifique A des hématies des hommes des groupes sanguins A et AB, haptène de Forssman, haptène polyosidique des bacilles tuberculeux, etc... Dans ce groupe de substances on remarque encore qu'il existe un parallélisme entre la présence d'osamines et celle de l'acide acétique, sans toutefois que l'on connaisse, d'une façon certaine, la nature de la liaison de l'acide acétique avec le polyside.

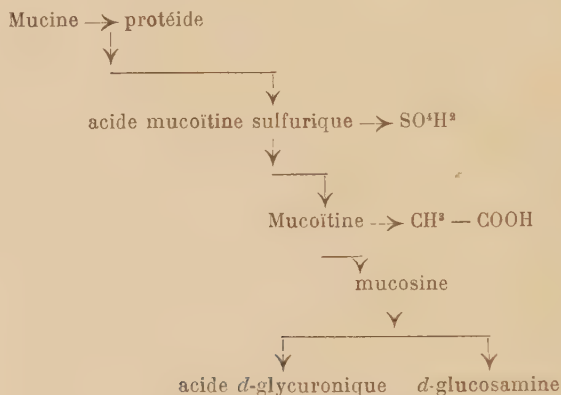
Une osamide de l'acide acétique existerait également dans un groupe de glucido-protéides isolés depuis longtemps des différents tissus et humeurs de l'organisme. Ces substances, dont la constitution est aujourd'hui connue, sont les mucines et les mucoïdes. Au premier groupe appartiennent les substances protéidiques produites par les cellules glandulaires abondantes le long du tube digestif, dans les conduits respiratoires et dans l'appareil reproducteur. Au groupe des mucoïdes qu'on appelle encore chondroglucoprotéides et aussi chondroïdes, appartiennent des substances présentes dans le cartilage, les os, la peau et les tendons. Ces deux groupes de substances ont de grandes analogies dans leurs propriétés physico-chimiques et dans leurs constitutions chimiques : en particulier, on trouve parmi leurs produits d'hydrolyse un sucre aminé acétylé. La différence essentielle entre ces substances consiste précisément dans le fait que dans les mucines ce sucre aminé est la glucosamine, tandis que dans les mucoïdes il s'agit de la chondrosamine. Ces deux sucres sont isomères, le premier correspond au *d*-glucose, le second au *d*-galactose ; c'est-à-dire qu'ils ne diffèrent que par la rotation des atomes fixés au carbone 4 (voir formule ci-dessous) :



La constitution de la mucine a pu être établie par l'étude

de ses produits d'hydrolyse. Traitée par les alcalis étendus cette substance libère d'abord un corps complexe qui renferme de l'acide sulfurique estérifié : l'acide mucoïtine sulfurique. Au cours de l'hydrolyse celui-ci se dédouble ensuite en acide sulfurique et en mucoïtine qui, à son tour, se scinde en formant de l'acide acétique et de la mucosine. Celle-ci est une combinaison moléculaire de *d*-glucosamine et d'acide glycuronique.

L'ensemble de ces réactions peut être représenté schématiquement de la façon suivante :



Ainsi la présence d'acide acétique dans les corps contenant des oses aminés semble être un fait assez général en chimie biologique, nous la constatons dans un groupe de glucido-protéides répandus abondamment dans l'organisme animal, c'est le groupe des mucines et des mucoïdes ainsi que dans un grand nombre de polysides d'origine très diverse. De sorte que nous pouvons nous demander si, dans le sérum, il n'existe pas un rapport entre les glucido-protéides, dans la constitution desquels se trouvent des oses aminés, et l'acide acétique découvert par nous. Aussi avons-nous jugé utile de rappeler succinctement quelques faits relatifs aux glucido-protéides sériques.

ETUDE DES GLUCIDO-PROTÉIDES SÉRIQUES.

SÉROMUCOÏDE. — La première fraction glucido-protéidique

que l'on a découverte dans le sérum semble appartenir au groupe des mucines. Il s'agit de la fraction découverte par Zanneti en 1887 (7) et appelée par lui séromucoïde. Cette substance est soluble dans l'eau et ses solutions ne sont pas coagulables par chauffage au bain-marie bouillant. Elle donne par hydrolyse des produits parmi lesquels Zanneti (8) a caractérisé l'acide sulfurique, la glucosamine et probablement l'acide acétique. En outre, selon Bywaters (9), elle a une teneur en glucides de 25 p. 100. Le séromucoïde a donc tous les caractères chimiques et physico-chimiques des mucines et, comme les mucines, il doit être acétylé. Aussi devons-nous nous poser la question de savoir s'il y a une relation entre la quantité d'acide acétique que nous avons trouvée (10) dans les protéides totaux et la quantité de séromucoïde contenue dans le sérum.

On admet généralement que la teneur du sérum en séromucoïde varie entre les limites extrêmes de 0 gr. 2 et 0 gr. 9 par litre de sérum. Donc cette teneur est faible et la quantité d'acide acétique libérée par hydrolyse du sérum dépasse de beaucoup celle qui pourrait provenir du séromucoïde. Cependant en examinant attentivement le mode d'obtention du séromucoïde on peut se demander s'il est quantitatif. En effet ce corps est obtenu à partir du sérum privé des globulines, par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium, puis de l'albumine, par coagulation. Ainsi une fraction plus ou moins importante du séromucoïde a pu être adsorbée, en particulier par le coagulum albuminique. Cette éventualité a été admise par Hewitt (11) dans l'un de ses travaux sur le fractionnement de la sérumalbumine. Pour cet auteur, l'albumine, telle qu'elle est préparée communément, n'est pas un protéide unique mais elle est constituée d'un mélange d'albumine cristallisable, privée de glucides, avec un glucido-protéide que Hewitt avait cru, tout d'abord, être le séromucoïde. S'il en était bien

(7) ZANNETI. *Ann. chim. med. Farm. et Farmac.*, 25-26, 1897, p. 529.

(8) ZANNETI. *Gazzetta Italiana*, 33 (1), 1903, p. 160.

(9) BYWATERS. *Biochem. Zeit.*, 15, 1909, p. 322.

(10) Dans notre premier travail (*C. R. Ac. Sc.*, 207, 1938, p. 601) nous avons trouvé que la quantité d'acide acétique (exprimée en centimètres cubes N/20 libérée par 1 litre de sérum est de 100 cent. cubes.

(11) HEWITT. *Biochem. Journ.*, 30 (2), 1936, p. 2229.

ainsi il faudrait admettre, en se basant sur les teneurs en glucides de l'albumine et du séromucoïde, que ce dernier existe dans le sérum au taux de 2 gr. 2 par litre. De sorte que 90 p. 100 du séromucoïde seraient entraînés par l'albumine au cours de la coagulation par chauffage qui précède l'isolement de la substance. Dans cette hypothèse, la quantité d'acide acétique libérée par le sérum à partir du séromucoïde ne serait plus négligeable.

Cependant, reprenant l'étude du glucido-protéide qui semble souiller l'albumine, Hewitt (12) a démontré, en comparant les teneurs en glucides et en cystine des fractions albuminiques, que ce glucido-protéide ne pouvait pas être le séromucoïde. C'est ce qui ressort de l'exemple suivant. Une fraction a été isolée dont la teneur en glucides est de 9,5 p. 100. Le séromucoïde a une teneur en glucides de 23 p. 100. Donc, dans l'hypothèse où le glucido-protéide est du séromucoïde, il faudrait admettre que cette fraction est constituée de 38 p. 100 de séromucoïde et de 62 p. 100 d'albumine cristallisable, privée de glucide. D'autre part, la teneur en cystine de l'albumine cristallisable est de 5,8 p. 100. La teneur en cystine de la fraction étudiée doit donc être supérieure à $\frac{62 \times 5,8}{100} = 3,6$

p. 100 qui est le taux de cystine dû uniquement à la présence de l'albumine cristallisable. Or, cette fraction renferme moins de 1,8 p. 100 de cystine. Nous pouvons donc conclure que le glucido-protéide de la sérumalbumine n'est pas le séromucoïde et que celui-ci n'est pas adsorbé par le coagulum albuminique. Le mode d'obtention du séromucoïde serait quantitatif et la teneur de ce dernier dans le sérum serait bien celle indiquée par les auteurs, elle est très faible et la quantité d'acide acétique qu'il libère ne peut représenter qu'une fraction très faible de la quantité d'acide acétique libéré par les protéides sériques totaux. Nous sommes donc autorisés à rechercher dans les fractions albuminiques et globuliniques l'origine de l'acide acétique que nous avons isolé à partir du sérum.

(12) HEWITT. *Biochem. Journ.*, **31**, 1937, p. 360.

FRACTIONS GLUCIDIQUES DE LA SÉRUMALBUMINE.

On peut conclure de l'étude précédente que Hewitt a caractérisé dans la sérumalbumine un glucido-protéide nouveau. Hewitt a donné à ce glucido-protéide le nom de séroglycoïde. Séromucoïde et séroglycoïde diffèrent par leur constitution chimique. C'est ainsi que, tandis que le séromucoïde renferme 25 p. 100 de glucides, en dépit des multiples méthodes de fractionnement, il n'a pas été possible d'obtenir le séroglycoïde avec une teneur de plus de 10 à 11 p. 100 de glucide. Ils diffèrent aussi par leurs caractères physico-chimiques. Les solutions de l'un et de l'autre ne sont pas coagulées par chauffage. Cependant, tandis que le séroglycoïde en solution étendue et en présence d'une quantité appréciable de protéides coagulables est entraîné par ces protéides au cours de leur coagulation, le séromucoïde au contraire n'est pas entraîné dans ces mêmes conditions et c'est même, comme nous l'avons vu, par ce moyen qu'il est préparé.

Selon Hewitt le sérum de cheval aurait la composition suivante :

Globuline	3,6 p. 100
Albumine cristallisable	2,8 —
Séroglycoïde	0,3 —
Séromucoïde	0,05 —

Cependant de nouvelles fractions glucido-protéidiques ont été obtenues depuis. C'est ainsi que, plus récemment, Hewitt (13) a isolé, à partir de la fraction albuminique, un nouveau glucido-protéide qu'il a appelé Globoglycoïde. Ce protéide est une globuline. Il est obtenu en versant dans une solution d'albumine cristallisable, privée de séroglycoïde et soigneusement ajustée à pH 7,0, un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité qui se forme constitue le globoglycoïde. La teneur de cette fraction albuminique en glucides est d'environ 3 p. 100. La quantité isolée à partir de la fraction albuminique du sérum

(13) HEWITT. *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 26.

est de 1 gramme par litre de sérum. Mais il est probable que la fraction globulinique renferme, elle aussi, une certaine quantité de globoglycoïde. Ce protéide se distingue du séromucoïde et du séroglycoïde par sa teneur en glucides, par ses propriétés physico-chimiques et en particulier par le fait qu'il est coagulé par chauffage au bain-marie bouillant.

Keckwick (14) a repris l'étude du fractionnement de l'albumine et a isolé deux fractions qu'il a soumises à des cristallisations successives. Il a trouvé que le rapport $\frac{\text{glucides}}{\text{azote}}$ devient rapidement constant au cours des recristallisations et que l'écart est très grand entre les valeurs des rapports des deux fractions. Keckwick a donc pu isoler deux substances cristallisées chimiquement distinctes. L'une est sans doute identique à l'albumine cristallisée de Hewitt. Elle est probablement dépourvue de glucide. L'autre a une teneur en glucide beaucoup plus faible que celle du séroglycoïde amorphe de Hewitt. Il semble, au surplus, qu'un autre glucido-protéide est éliminé au cours des recristallisations. Ce glucido-protéide aurait une teneur en glucides élevée.

TENEUR EN GLUCIDES DE LA SÉRUMGLOBULINE. — La sérumglobuline renferme, d'après Soerensen et Haugaard (15), 1,82 p. 100 de glucides exprimés en mannose-galactose et, d'après Hewitt (16), 3,3 p. 100 de glucides exprimés en galactose-mannose-glucosamine. D'ailleurs, le fractionnement de la sérumglobuline, comme celui de l'albumine, aboutit à l'isolement de fractions ayant des teneurs différentes en glucides. C'est ainsi que Hewitt (17) a comparé les teneurs en glucides de différentes fractions globuliniques. Les résultats de ce fractionnement sont reproduits ci-dessous. Ils sont exprimés en galactose-mannose pour 100 grammes de protéïdes.

(14) KECKWICK. *Biochem. Journ.*, 32, 1938, p. 552.

(15) SOERENSEN et HAUGAARD. *Biochem. Zeits.*, 1933, p. 273.

(16) HEWITT. *Biochem. Journ.*, 28, 1934, p. 2080.

(17) HEWITT. *Biochem. Journ.*, 32, 1938, p. 26.

	EUGLOBULINE I	EUGLOBULINE II	PSEUDO- GLOBULINE	GLOBO- GLYCOÏDE
Fraction la moins soluble.	1,8	2,2	1,4	4,6
Fraction intermédiaire . .	2,4	2,8	1,7	
Fraction la plus soluble .	2,9	3,6	2,3	

CONSTITUTION DU GROUPE PROSTHÉTIQUE GLUCIDIQUE DES ALBUMINES ET DES GLOBULINES. — La constitution chimique des glucido-protéides albuminiques et globuliniques n'est pas parfaitement connue. On ne sait pas, en particulier, si les glucides qu'ils renferment sont acétylés. En effet, pour séparer les glucides des protéides, on doit faire appel à des méthodes d'hydrolyse énergiques qui non seulement élimineraient les radicaux acétyles fixés éventuellement sur ces glucides, mais encore aboutissent à une destruction notable de ces derniers.

C'est ainsi que Rimington (18) sépare le groupement glucidique lié aux protéides sériques en soumettant ces protéides au traitement suivant : 100 grammes du mélange albumine-globuline sont versés dans 1 litre de solution de baryte à 10 p. 100 et le tout est maintenu à l'ébullition dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux pendant huit heures. D'ailleurs, la durée de l'hydrolyse a été jugée, par la suite, insuffisante et elle a dû être portée à trente heures, puis à trente-six heures. Le glucide est ensuite isolé de l'hydrolysât après un traitement long et pénible.

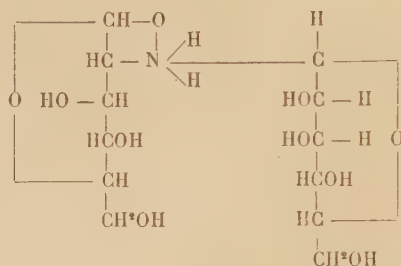
Plus récemment Bierry (19) a repris l'étude de ce glucide en adoptant une méthode d'hydrolyse également énergique. Les protéides du plasma sanguin sont isolés; délipidés et mis en solution dans la soude N. La solution est portée une demi-heure à l'autoclave à 120°. Cette première hydrolyse est suivie d'une seconde, faite en présence de baryte (3 volumes de solution de baryte à 10 p. 100 pour 1 volume de solution), à l'autoclave et à la température de 120° que l'on maintient pendant une heure.

La constitution du glucide isolé selon ces techniques a été

(18) RIMINGTON. *Biochem Journ.*, **25** (2), 1931, p. 1062.

(19) BIERRY. *C. R. Ac. Sc.*, **198**, 1934, p. 1542.

longtemps discutée. Rimington a proposé tout d'abord la formule suivante (20) :



dans laquelle une molécule de glucosamine est associée à une molécule de mannose. Cependant, à la suite des travaux de Levene et Mori (21), selon lesquels le glucide de l'ovalbumine et de l'ovomucoïde serait une dimannose-glucosamine, Rimington démontre, dans un nouveau travail (22), que la constitution du glucide des protéïdes sériques est identique à celle du glucide des protéïdes du blanc d'œuf. Plus récemment Bierry (23) a pu mettre en évidence la présence de galactose aussi bien parmi les produits de clivage direct des albumines par les acides que parmi les produits de clivage du glucide provenant de l'attaque préalable des albumines par les alcalis dilués. Soerensen et Haugaard aboutissent à la même conclusion en étudiant des préparations très purifiées de sérumalbumine. De sorte que ce glucide serait constitué de *d*-mannose, de *d*-galactose et de *d*-glucosamine. Il est bien évident que le glucide isolé, comme il a été dit plus haut, ne peut pas être acétylé, à supposer même qu'il le soit dans les protéïdes.

On peut conclure de ce bref exposé sur les glucides protéïdiques :

1° Qu'il existe dans le sérum des osides liés aux protéïdes. Dans la constitution de ces osides entrent, entre autres, des oses aminés. L'un, celui du séromucoïde, a une constitution

(20) RIMINGTON. *Biochem. Journ.*, **23**, 1929, p. 430.

(21) LEVENE et MORI. *J. biol. Chem.*, **84**, 1929, p. 49.

(22) RIMINGTON. *Biochem. Journ.*, **25** (2), 1931, p. 1062.

(23) BIERRY. *C. R. Acad. Sc.*, **191**, 1930, p. 1381.

voisine de celle du groupement prosthétique des mucines, l'autre renferme du *d*-mannose, du *d*-galactose et de la *d*-glucosamine.

2° Le groupement prosthétique du séromucoïde est très probablement acétylé, mais aucun fait ne prouve que le second le soit aussi.

3° La teneur du sérum en séromucoïde étant minime, la quantité d'acide acétique provenant de ce glucido-protéide est elle-même très petite.

PREMIÈRE PARTIE

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE LIÉ AUX PROTÉIDES SÉRIQUES

Le premier problème que nous avons eu à résoudre est celui du dosage des acides volatils fixés sur les protéides sériques. Ce problème comprend en réalité deux parties : la mise en liberté de l'acide et son entraînement.

Les techniques d'entraînement des acides volatils qui ont été proposées par différents auteurs sont toutes basées sur un principe très simple et le dispositif adopté répond en général parfaitement au but proposé. A notre tour, nous présenterons un dispositif inspiré de ceux décrits par les auteurs qui ont étudié cette question avant nous-mêmes.

La mise en liberté de l'acide par hydrolyse présente, par contre, des difficultés beaucoup plus grandes. De nombreux auteurs ont étudié la question et ont proposé des solutions de valeurs inégales. Nous nous sommes attaché avec un soin particulier à l'étude critique des diverses techniques adoptées avant nous. Quelques-unes d'entre elles se sont révélées inacceptables, d'autres ont pu être adaptées au cas qui nous intéresse.

A. — Exposé de quelques techniques de dosage des acides volatils liés aux substances biologiques.

I. — DOSAGE DES ACIDES VOLATILS FIXÉS SUR LES COMPOSÉS ORGANIQUES.

La libération des acides volatils, fixés sur les composés organiques sous forme d'esters alcooliques, phénoliques,

thioliques ou sous forme d'amide, peut se faire soit par hydrolyse alcaline, soit par hydrolyse acide. De plus, différents acides et différentes bases peuvent être utilisés comme agents d'hydrolyse.

Dans certaines techniques, l'acide libéré est dosé dans l'hydrolysât même, ces techniques ne peuvent être appliquées que dans des cas très particuliers.

Nous n'envisagerons dans cet exposé que les méthodes dans lesquelles les acides volatils, libérés par hydrolyse, sont entraînés par la vapeur d'eau avant d'être dosés ; elles sont d'une application très générale.

EXPOSÉ HISTORIQUE DES TECHNIQUES. — Une des premières méthodes basée sur ce principe et qui a servi de point de départ à l'élaboration des autres techniques, est la méthode de Wenzel (24).

Wenzel a adopté comme agent d'hydrolyse l'acide sulfurique et a appliqué sa méthode au dosage de l'acide acétique fixé sur différents composés organiques.

L'appareil utilisé est constitué par un premier ballon muni de trois tubulures : l'une est terminée par un entonnoir à robinet, une autre est constituée par un tube capillaire arrivant jusqu'au fond du ballon et pouvant être mis en relation avec un appareil producteur d'hydrogène, la troisième tubulure est réunie à un réfrigérant légèrement ascendant. Ce réfrigérant est terminé par un tube coudé qui arrive jusqu'au fond d'un deuxième ballon rempli de billes de verre. Celui-ci est réuni à un deuxième réfrigérant dont l'extrémité s'engage dans une fiole conique qui peut être mise en relation avec une trompe à vide. Cette fiole renferme une quantité connue de solution de potasse N/10 et est destinée à recevoir le distillat.

Dans le premier ballon on introduit 0 gr. 4 de substance acétylée puis, par l'entonnoir, 3 c. c. 5 d'acide sulfurique à 50 p. 100. Ce ballon est maintenu dans un bain-marie jusqu'à la fin de l'hydrolyse. On introduit alors par l'entonnoir 20 cent. cubes d'eau bouillante et on distille à nouveau.

L'auteur a constaté que la concentration en acide sulfu-

(24) HOUBEL-WEYL. *Die Methoden der organischen Chemie*, p. 30.

rique la plus favorable correspond à celle indiquée ; parfois cependant on a utilisé des concentrations moindres. De toute façon, on fait généralement un essai préliminaire pour déterminer la concentration optimum. A cette concentration, on ne doit pas observer une coloration trop forte et une formation trop abondante d'anhydride sulfureux.

L'auteur titre dans le distillat d'abord l'acidité totale en présence de phénolphthaléine, puis, iodométriquement l'acide sulfureux. La différence entre ces deux déterminations représente l'acidité due à l'acide acétique.

Plus récemment Freudenberg (25) a mis au point une technique de dosage qui utilise comme agent d'hydrolyse l'acide paratoluènesulfonique. Cet auteur a décrit un nouveau dispositif et a donné les résultats relatifs à une série de composés acétylés : l'hexacétylmannite, l'octacétylcellobiose, le pentacéthylglucose, etc..., les résultats obtenus par l'auteur sont satisfaisants.

Pregl et Soltys (26) ont entrepris l'étude critique des deux techniques qui viennent d'être décrites sur un certain nombre de composés acétylés.

Ces auteurs constatent que la technique de Wenzel permet d'obtenir des valeurs qui sont apparemment exactes pour un certain nombre de substances. Ils remarquent cependant que dans le domaine des glucides, et dans le cas d'autres substances aussi, cette méthode conduit à des résultats trop élevés. L'erreur proviendrait de l'action secondaire qu'exerce l'acide sulfurique sur ces substances au cours de l'hydrolyse et qui aboutit à la formation d'acides volatils qui distillent ensuite en même temps que l'acide acétique libéré.

Par contre, l'action de l'acide paratoluènesulfonique serait nettement plus délicate que celle de l'acide sulfurique et on aboutirait ainsi à des résultats exacts dans le dosage de l'acide acétique fixé sur les glucides. Cependant, de même que l'acide sulfurique, l'acide paratoluènesulfonique donne naissance, au cours de l'hydrolyse, à de l'anhydride sulfureux en quantité, il est vrai, beaucoup moins grande. Dans leurs

(25) FREUDENBERG. *Z. angew. Chem.*, 38 (5), 1925, p. 280.

(26) PREGL et SOLTYS. *Mikrochemie*, 1929, p. 1.

premiers travaux Pregl et Soltys ont suivi les indications de Wenzel et ont dosé iodométriquement l'anhydride sulfureux présent dans le distillat. Par la suite, ils ont proposé une modification très ingénieuse : plutôt que de doser l'anhydride sulfureux formé au cours de l'hydrolyse, ils le retiennent en faisant passer les vapeurs dans un tube en U rempli de billes de verre mouillées avec une solution tampon de phosphate. Ce tube en U est placé entre le ballon où a lieu l'hydrolyse et le réfrigérant, il porte sur une longueur de 3 centimètres une bourre de coton de verre permettant de retenir le phosphate qui pourrait être entraîné vers le réfrigérant.

Pregl et Soltys jugent nécessaire d'éliminer le gaz carbonique qui se trouve dans le distillat. Dans ce but le distillat est acidifié avec de l'acide chlorhydrique, ajouté en quantité connue et est porté à l'ébullition pendant vingt secondes. Dans ces conditions, le gaz carbonique est chassé complètement sans qu'il y ait perte d'acide acétique.

Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes : pour une prise d'essai de 5 milligrammes de substance on utilise 1 cent. cube d'une solution d'acide paratoluènesulfonique à 25 p. 100. On poursuit l'hydrolyse pendant vingt à quarante minutes suivant la nature de la liaison du groupement acétylé. L'hydrolyse se fait à 100°.

On donne les résultats d'analyse de l'heptacétylméthylgentiobiose, de l'octacétylgentiobiose et de la pentacétylcatéchine. L'erreur est inférieure à $\pm 0,05$ p. 100.

Le problème du dosage des acides volatils fixés sur les substances organiques a été repris plus récemment par Kuhn et Roth (27). Ces auteurs ont étudié les conditions d'hydrolyse et d'entraînement des radicaux acétyles et benzoyles. Ils ont également appliqué leur technique au dosage du radical méthyle fixé sur les chaînes carbonées. Les substances étudiées sont : le pentacétylglucose, l'hexacétylmannite, l'acétanilide, l'acétylglycocolle, etc...

L'intérêt de ce travail réside surtout dans le fait que ces auteurs ont réalisé, en même temps que l'hydrolyse acide, l'hydrolyse alcaline des dérivés acétylés rendant ainsi aisée

(27) KUHN et ROTH. *Berichte Gesells.*, 66 (2), 1933, p. 274.

l'étude d'un grand nombre de composés dont l'hydrolyse acide est très lente. Les agents d'hydrolyse utilisés sont l'acide sulfurique à 50 p. 100 et l'acide paratoluènesulfonique à 25 p. 100 dans le cas de l'hydrolyse acide, et dans le cas de l'hydrolyse alcaline, soit une solution aqueuse de soude 5 N, soit une solution N de soude dans l'alcool méthylique. De plus, on propose un dispositif plus simple que ceux déjà décrits : l'appareil est constitué essentiellement d'un ballon à 3 tubulures semblable à celui utilisé par Wenzel et d'un réfrigérant adapté à une tubulure du ballon. Ce réfrigérant par simple rotation autour de l'axe de la tubulure peut fonctionner, soit à reflux au cours de l'hydrolyse, soit comme réfrigérant descendant au cours de l'entraînement. L'entraînement des acides volatils se fait à la pression atmosphérique.

Enfin ces auteurs estiment qu'on peut éviter de doser l'anhydride sulfureux qui passe dans le distillat. Il suffit, en effet, de porter le distillat à l'ébullition pendant sept à huit secondes pour éliminer en même temps que le gaz carbonique, l'anhydride sulfureux qui le souille.

Il est remarquable de constater que les résultats publiés concordent d'une façon très satisfaisante, quel que soit l'agent d'hydrolyse utilisé. On n'observe en particulier aucune différence sensible dans le comportement des glucides acétylés, vis-à-vis de l'acide sulfurique et de l'acide paratoluènesulfonique. Ces résultats s'opposent ainsi aux conclusions de l'étude critique de Pregl et Soltys.

Nous verrons enfin qu'à la suite de Kuhn et Roth, d'autres chercheurs et nous-même avons adopté le principe de l'hydrolyse alcaline pour l'étude des dérivés acétylés présents dans les milieux biologiques complexes et avons abouti à des résultats contradictoires. Nous nous proposons de faire la critique de cette méthode et d'y apporter des modifications importantes.

II. — QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATION DES TECHNIQUES PRÉCÉDENTES AU DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES ACÉTYLÉS.

Les principes des méthodes que nous venons de rappeler ont été adoptés par les auteurs qui se sont proposé de doser

l'acide acétique dans différentes substances acétylées présentes dans les milieux biologiques plus ou moins complexes.

Avery et Goebel ont caractérisé et dosé l'acide acétique de l'acétylpolyoside du pneumocoque (28) en hydrolysant la solution du polyoside par un volume égal de soude N, pendant quarante minutes, au bain-marie bouillant. Après acidification par l'acide sulfurique l'hydrolysât est distillé dans le vide. Le distillat est recueilli dans un flacon contenant une suspension de carbonate d'argent fraîchement préparé. Par la suite on sépare, le sel d'argent soluble formé, de l'excès de carbonate d'argent. Des poids respectifs du sel d'argent et de l'iodure d'argent formé à partir de ce sel on a déduit que l'acide isolé était l'acide acétique.

K. Meyer et J. Palmer (29) dans leurs travaux sur les polyosides de l'humeur vitreuse ont dosé l'acide acétique fixé sur ces polyosides en utilisant la méthode de Kuhn et Roth légèrement modifiée. Les premiers résultats publiés par ces auteurs ont été obtenus en hydrolysant les substances extraites de l'humeur vitreuse au moyen d'une solution alcoolique de soude. Ils ont abouti à la conclusion que la substance renferme deux radicaux acétyles par équivalent. Cependant, poursuivant leurs travaux (30), ces mêmes auteurs ont constaté qu'en substituant, comme agent d'hydrolyse, l'acide paratoluènesulfonique à la soude, le polyoside paraissait ne plus posséder qu'un seul radical acétyle par équivalent.

Par la suite, K. Meyer et J. Palmer ont adopté définitivement l'acide paratoluènesulfonique dans l'hydrolyse des polyosides, en particulier de ceux isolés du cordon ombilical.

A leur tour Herriot et Northrop (31) ont utilisé l'hydrolyse alcaline pour doser l'acide acétique des dérivés acétylés de la pepsine. La technique adoptée est la suivante : on sépare la pepsine par précipitation au moyen d'une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Après plusieurs lavages à l'eau le précipité est dissous dans un peu d'alcali ou de phosphate de soude. Cette solution est hydrolysée au moyen d'une solu-

(28) AVERY et GOEBEL. *J. of exper. Med.*, **58** (2), 1933, p. 731.

(29) K. MEYER et J. PALMER. *J. biol. Chem.*, **107**, 1934, p. 629.

(30) K. MEYER et J. PALMER. *J. biol. Chem.*, **114**, 1936, p. 689.

(31) HERRIOT et NORTROP. *Journ. of gen. Physiol.*, **18**, 1935, p. 36.

tion de soude 4 N, à la température de 35° pendant au moins cinq jours. Après acidification, au moyen de l'acide phosphorique, l'hydrolysats est distillé et le résidu soumis à trois entraînements successifs.

Dans d'autres essais, les auteurs ont hydrolysé les dérivés acétylés de la pepsine à la température de 100° pendant cinq jours avec une solution de soude 0,4 N. Ils ont également adopté l'hydrolyse acide, au moyen de l'acide paratoluène-sulfonique à 25 p. 100, à la température de 100° pendant six heures.

Ces trois méthodes n'ont pas donné des résultats identiques. Ceux correspondant à l'hydrolyse alcaline faite à 100° sont supérieurs à ceux correspondant à l'hydrolyse alcaline à 35° et à l'hydrolyse acide.

Les auteurs attirent l'attention sur les inconvénients qui résultent de l'emploi de l'acide trichloracétique pour l'isolement de la pepsine. Ils ont constaté, en effet, que cet acide se fixe en quantité très faible sur le protéide, très probablement en se combinant à un groupement NH^2 libre. L'acide ainsi fixé échappe aux lavages du précipité et distille par la suite, en même temps que l'acide acétique.

Byron, Hendrix et Paquin (32), dans un travail sur l'action des alcalis sur les protéides acétylés ont également utilisé l'hydrolyse alcaline pour libérer l'acide acétique qui a été fixé sur le protéide. L'hydrolyse a été faite au moyen de la soude N, à la température de 100°, pendant six heures dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux.

Les auteurs attirent l'attention sur l'erreur qui résulte de la formation d'hydrogène sulfuré au cours de l'hydrolyse des protéides. Ils proposent de précipiter l'hydrogène sulfuré dans l'hydrolysats même par addition d'un excès de litharge. Le sulfure de plomb et l'excès de litharge sont ensuite éliminés par filtration.

De plus ils jugent nécessaire de pratiquer l'entraînement de l'acide acétique sur les protéides préalablement précipités par addition au filtrat d'une solution de tungstate de sodium à 10 p. 100.

(32) BYRON, HENDRIX et PAQUIN. *J. biol. Chem.*, **124**, 1938, p. 35.

Dans une note (33) où nous avons signalé, pour la première fois, la présence d'acide acétique fixé sur les protéides du sérum de cheval, nous avons indiqué très brièvement les conditions de dosage adoptées. Nous tenons à les rappeler ici et à préciser en même temps quelques détails de la technique employée. Ces détails, que nous n'avions pas jugés utile de mentionner dans notre communication, se sont révélés par la suite très importants. Ils nous ont permis, comme nous le verrons dans la partie critique de cette étude, d'aboutir à des conclusions exactes du point de vue qualitatif sans toutefois que le principe de la méthode utilisée soit à l'abri de nombreuses critiques.

L'hydrolyse des protéides sériques a été faite à la température de 37° en présence de soude 0,4 N et a été prolongée pendant quatre à cinq jours. On acidifiait ensuite l'hydrolysât par addition d'acide citrique à 50 p. 100 et on entraînait l'acide volatil. On pratiquait en général trois à quatre entraînements après addition de 10 cent. cubes d'eau environ. Nous avons trouvé ainsi que la quantité d'acide volatil libérée par 100 cent. cubes de sérum correspond environ à 10 cent. cubes d'acide N/20.

L'étude des courbes de Duclaux, la détermination du coefficient de partage relatif au système eau-éther, ainsi que la pesée des cendres après neutralisation nous ont permis de conclure que l'acide volatil était l'acide acétique. Ces mesures ont été faites à partir d'une quantité assez notable de sérum hydrolysé comme il vient d'être indiqué. Par la suite, l'hydrolysât n'a subi que deux entraînements. Le distillat obtenu a été, après alcalinisation, concentré à faible volume puis acidifié et distillé à nouveau sans que le résidu ait été soumis à d'autres entraînements par la vapeur d'eau.

Par le fait des deux distillations successives, dans chacune desquelles nous n'avons recueilli que les fractions de tête, nous avons pu laisser dans les résidus, en même temps qu'une quantité non négligeable d'acide acétique, la majeure partie d'un acide moins entraînable que l'acide acétique.

Dans une communication plus récente (34) nous avons

(33) G. SANDOR et J. TABONE. *C. R. Acad. Sc.*, 207, 1938, p. 601.

(34) G. SANDOR et J. TABONE. *Bull. Soc. chim. biol.*, 21, 1939, p. 1254.

établi les courbes d'hydrolyse, en fonction du temps de différents échantillons de sérums plus ou moins acétylés sous l'action du cétène. Dans ce travail nous avons également adopté l'hydrolyse alcaline mais en nous plaçant dans des conditions de concentration et de température différentes de celles adoptées précédemment. Nous avons opéré en solution sodique N/2 à la température du bain-marie bouillant. De plus, pour déterminer la quantité d'acide acétique fixé sur les protéides par acétylation nous avons établi les différences entre les quantités d'acides entraînables contenues dans le sérum avant et après acétylation, en opérant pour l'un et pour l'autre dans des conditions rigoureusement identiques.

B. — Etude critique des techniques de dosage des acides volatils fixés sur les substances biologiques.

Dans l'exposé qui précède nous avons vu que les auteurs ont adopté indifféremment l'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline pour libérer les acides volatils fixés sur les substances biologiques (polyosides, protéides).

Dans l'étude qui suit nous examinerons l'action des agents d'hydrolyse sur les principaux éléments participant à la constitution des protéides et sur les protéides sériques. A partir des conclusions de cette étude nous établirons la technique qui sera adoptée dans ce travail pour le dosage de l'acide acétique lié aux protéides sériques.

1° COMPORTEMENT DES SUCRES VIS-A-VIS DES AGENTS D'HYDROLYSE.

Nous avons vu, dans la partie historique de ce travail, que les glucido-protéides sériques libèrent, par hydrolyse, du *d*-galactose, du *d*-mannose et de la *d*-glucosamine. Ces sucres subissent ensuite l'action des agents d'hydrolyse qui les ont libérés. Nous n'envisagerons ici que le comportement du glucose vis-à-vis des agents d'hydrolyse.

a) ACTION DES ALCALIS SUR LES SUCRES. — L'action des alcalis

sur les sucres est bien connue. Elle se fait sentir déjà quand la concentration en ions OH^- est faible et à la température ordinaire. On observe alors que les modifications α et β atteignent instantanément leur état d'équilibre. A une concentration alcaline plus élevée le sucre se transforme en un mélange d'isomères. Ainsi le *d*-glucose, le *d*-mannose et le *d*-fructose se transforment les uns dans les autres et on a toujours un mélange des trois. A température plus élevée le phénomène change et si on fait bouillir une solution étendue du glucose avec KOH (N/10 à N/100) on obtient du méthylglyoxal qui distille et de l'aldéhyde glycérique qui reste dans le résidu. A une concentration plus élevée encore (dans de la soude à 5 p. 100 ou à 10 p. 100) il y a formation d'acide lactique. L'acide lactique sera donc normalement présent dans les hydrolysats alcalins des substances biologiques, dans la constitution desquelles interviennent des oses, quand l'hydrolyse aura lieu à une température assez élevée et pour des concentrations en ions OH^- assez grandes. Ces conditions sont voisines de celles adoptées par de nombreux auteurs et par nous-mêmes pour doser l'acide acétique fixé sur des polyosides ou sur des protéides. Nous avons donc jugé utile d'étudier ici le comportement de l'acide lactique au cours de l'entraînement des acides volatils par la vapeur d'eau, d'adopter une méthode de destruction de l'acide lactique et de vérifier, enfin, si ce dernier acide est le seul qui se forme au cours du traitement du glucose par les alcalis.

Entraînement de l'acide lactique par la vapeur d'eau. — L'expérience suivante nous montre le comportement de l'acide lactique au cours de l'entraînement des acides volatils par la vapeur d'eau. 30 cent. cubes d'une solution d'acide lactique équivalant à 5 c. c. 10 d'une solution acide N/20 sont placés dans le ballon de l'appareil qui sera décrit dans le chapitre suivant (voir page 31). On soumet la solution à dix entraînements successifs par la vapeur d'eau. Chaque entraînement se fait à partir du deuxième par introduction de 10 cent. cubes d'eau dans le ballon et est poursuivi jusqu'à ce que le volume du liquide restant soit d'environ 3 à 4 cent. cubes. Nous avons trouvé dans le distillat, après la première distillation : 7 p. 100 de l'acidité totale ; après la deuxième :

11 p. 100 ; après la troisième : 23 p. 100 ; après la quatrième 30 p. 100 ; après la cinquième : 36 p. 100 ; après la dixième : 57 p. 100.

A titre de comparaison nous avons répété les mêmes expériences avec une solution d'acide acétique : 30 cent. cubes d'une solution correspondant à 5 c. c. 10 d'une solution acide N/20 sont soumis à des entraînements par la vapeur d'eau dans des conditions identiques à celles de l'expérience précédente. Nous avons trouvé après le premier entraînement 71 p. 100 de l'acidité totale ; après le deuxième : 94 p. 100 ; après le troisième : 98 p. 100 ; après le quatrième : 100 p. 100.

De ces deux expériences nous pouvons conclure que l'acide lactique, lorsqu'il est présent dans les hydrolysats provenant de milieux biologiques acétylés, intervient pour fausser le dosage de l'acide acétique (*). Cependant l'acide lactique est détruit facilement par les agents oxydants à action relativement modérée sans que l'acide acétique soit touché dans les mêmes conditions.

Destruction de l'acide lactique. — Les méthodes de destruction spécifique de l'acide lactique sont nombreuses. Exposé à l'action des rayons ultra-violets, l'acide lactique se décompose avec formation de gaz carbonique accompagné de traces d'oxyde de carbone (35). L'acide lactique est oxydé à l'état d'acétaldéhyde par le permanganate en présence de sulfate manganoux qui rend la réaction quantitative. C'est là le principe d'une méthode de dosage de l'acide lactique. A ces méthodes nous avons préféré, pour différentes raisons, la

(*) A ce propos nous pouvons mentionner que dans notre premier travail nous devons être en présence d'un mélange d'acide acétique et d'acide lactique. En effet, nous avons effectué une hydrolyse alcaline du sérum dialysé et les protéides sériques contiennent des glucides. Ceux-ci étaient donc transformés en partie en acide lactique. Pourtant, d'après les courbes de Duclaux et le coefficient de partage, ainsi que d'après la détermination du poids des cendres, il s'agissait manifestement de l'acide acétique pratiquement pur. Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent (voir p. 21), pour effectuer ces études physico-chimiques nous n'avons utilisé que les premières portions des distillats, de sorte que la solution étudiée ne devait contenir qu'une très faible fraction de l'acide lactique présent dans l'hydrolysat alcalin.

(35) BURNS. *J. Amer. Chem. Soc.*, 51, 1929, p. 3165.

méthode de Friedermann (36). Cet auteur propose de détruire l'acide lactique et l'acide pyruvique qui souillent souvent les distillats des acides volatils provenant des cultures bactériennes, en soumettant ces distillats à l'action de l'oxyde rouge de mercure en présence de l'acide sulfurique et du sulfate de magnésie à la température de l'ébullition. Dans ces conditions, en même temps que l'acide lactique, sont détruits l'acide pyruvique, l'acide formique et l'acide crotonique.

Nous avons vérifié la méthode de Friedermann en ce qui concerne l'acide lactique : dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux nous avons introduit 50 cent. cubes d'une solution d'acide lactique équivalant à 5 c. c. 04 d'une solution acide N/20, puis 0 gr. 50 d'oxyde rouge de mercure, 20 grammes de sulfate de magnésie et 2 cent. cubes d'acide sulfurique à 50 p. 100. Le mélange est porté à l'ébullition pendant trente minutes, puis soumis à la distillation sous pression réduite jusqu'à début de cristallisation. Nous avons pratiqué trois entraînements supplémentaires. Nous avons retrouvé dans le distillat 12 p. 100 de l'acidité initiale. Après avoir renouvelé sur ce distillat le traitement qui vient d'être indiqué nous avons pu constater que la destruction de l'acide lactique était totale.

Donc, dans les conditions dans lesquelles opère Friedermann la destruction de l'acide lactique est complète, tout au moins si l'on effectue deux distillations successives en présence d'oxyde rouge de mercure.

Application aux solutions de glucose. — Nous avons dissous 0 gr. 10 de glucose dans 20 cent. cubes de soude N/2. La solution alcaline est placée dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux. On maintient le ballon pendant huit heures dans un bain-marie à l'ébullition. La solution est ensuite acidifiée par addition de 10 cent. cubes de solution d'acide citrique à 50 p. 100 et est soumise à l'entraînement par la vapeur d'eau. Nous avons trouvé que le distillat correspond à 6 c. c. 80 d'une solution acide N/20. Nous avons traité le distillat précédent suivant la technique de Friedermann. Après une première destruction le distillat correspond à 2 c. c. 20 et

(36) FRIEDERMANN. *J. biol. Chem.*, **123**, 1938, p. 161.

après une deuxième destruction le nouveau distillat correspond à 1 c. c. 63 de solution acide N/20.

Ainsi il se forme au cours du traitement du glucose par les alcalis des acides entraînaables par la vapeur d'eau autres que l'acide lactique et résistant à l'action de l'oxyde mercurique ou formant par oxydation des composés acides et entraînaables par la vapeur d'eau. Dans cette expérience le taux de ces acides est d'environ 23 p. 100 de l'acidité totale.

Nous pouvons donc conclure que les méthodes utilisant l'hydrolyse alcaline ne peuvent fournir que des résultats approchés. L'erreur sera d'autant plus grande que la quantité de sucre présent dans les milieux biologiques sera, elle-même, plus élevée.

b) ACTION DES ACIDES SUR LES SUCRES. — Les solutions étendues d'acide sulfurique et d'acide chlorhydrique décomposent les hexoses en un mélange d'acide lévulique et d'acide formique. Nous pouvons donc conclure que l'hydrolyse par l'acide sulfurique adoptée par certains auteurs conduit certainement à des résultats erronés, de sorte que nous n'avons examiné dans ce qui suit que l'action de l'acide paratoluènesulfonique sur les sucres. Nous avons déjà vu que de nombreux auteurs ont adopté ce dernier acide comme agent d'hydrolyse.

Action de l'acide paratoluènesulfonique sur le glucose. — 0 gr. 10 de glucose sont dissous dans 20 cent. cubes de solution N/2 d'acide paratoluènesulfonique. Cette solution est maintenue au bain-marie bouillant pendant huit heures, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux. Puis les acides volatils formés sont entraînés par la vapeur d'eau. Les résultats obtenus sont les suivants :

Le distillat correspond à 0 c. c. 20 d'acide N/20. Ce distillat après traitement par l'oxyde mercurique ne renferme plus d'acides volatils.

Nous pouvons donc conclure que l'acide paratoluènesulfonique ne réagit pas sur les sucres en formant à partir de ces derniers des acides entraînaables par la vapeur d'eau. La faible quantité d'acide présent dans le premier distillat, constituée, sans doute, par de l'anhydride sulfureux provenant d'une réduction partielle de l'acide paratoluènesulfonique

par le glucose, est complètement détruite au cours de l'oxydation par l'oxyde de mercure.

2° COMPORTEMENT DES ACIDES AMINÉS

VIS-A-VIS DES AGENTS D'HYDROLYSE.

Le problème qui se pose ici est celui d'une désamination éventuelle des acides aminés sous l'action des agents d'hydrolyse, désamination qui conduirait à la formation d'acides entraîna- bles.

Les faits relatifs à la désamination du glyocolle sont contradictoires. C'est ainsi que Hirschstein (37) a soutenu qu'après plusieurs jours de contact, avec la potasse à 1 p. 100 ou 5 p. 100, le glyocolle ne peut plus être retrouvé par la méthode au chlorure de β -naphtalènesulfonique. Au contraire, Abderhalden et Guggenheim (38) prétendent que le glyocolle résiste à un tel traitement et que, même par ébullition avec la potasse à 33 p. 100, le glyocolle ne perd pas d'ammoniaque.

Nous avons pu vérifier que le glyocolle ne donne naissance à aucun acide entraînable par la vapeur d'eau quand il se trouve placé dans les conditions adoptées dans ce travail pour l'hydrolyse des protéides sériques.

Nous mentionnerons ici le comportement de la cystéine qui, traité dans ces mêmes conditions, donne un premier distillat très faiblement acide ; cet acide est détruit par oxydation au cours du traitement par l'oxyde de mercure. Il s'agit d'acide sulfhydrique provenant du groupe sulhydrilé de la molécule.

3° COMPORTEMENT DES PROTÉIDES SÉRIQUES

VIS-A-VIS DES AGENTS D'HYDROLYSE.

De l'étude qui précède nous pouvons conclure que les hydrolysats sériques contiennent des acides entraîna- bles par la vapeur d'eau qui proviennent de la destruction des éléments constituant les protéides et que la quantité de ces acides dépend des conditions d'hydrolyse. Ces conclusions sont confirmées par l'expérience suivante. Des prises d'essai de

(37) HIRSCHSTEIN. *Arch. f. exper. Path. u. Pharm.*, 59, p. 401.

(38) ABDERHALDEN et GUGGENHEIM. *Zeit. phys. Chem.*, 59, p. 29.

10 cent. cubes d'un même sérum préalablement dialysé sont hydrolysées par un volume égal de solution de soude N et de solution d'acide paratoluènesulfonique N et à 50 p. 100. Les hydrolyses sont faites à volume constant et à 100°. Les entraînements par la vapeur d'eau sont faits dans l'appareil et selon la technique que nous décrirons au chapitre suivant. On dose les distillats provenant de l'hydrolysate (premier distillat) et celui provenant de la distillation du précédent distillat dosé puis traité par l'oxyde rouge de mercure selon la méthode de Friedermann (deuxième distillat). Les résultats sont reproduits dans le tableau I.

TABLEAU I.

AGENTS D'HYDROLYSE	DURÉE de l'hydrolyse	ACIDITÉ DES DISTILLATS exprimée en centimètres cubes N/20		
		1 ^{er} distillat	2 ^e distillat	Différence
<i>Soude :</i>				
10 cent. cubes de solution N.	7 h. 40 m.	4,40	2,20	1,90
10 cent. cubes de solution N.	17 h.	7,48	3,85	3,33
<i>Acide paratoluènesulfonique :</i>				
10 cent. cubes de solution N.	8 h. 20 m.	2,20	2,07	0,13
10 cent. cubes de solution à 50 p. 100.	4 h.	2,18	1,90	0,28
10 cent. cubes de solution à 50 p. 100.	4 h.	2,58	2,35	0,23
10 cent. cubes de solution à 50 p. 100.	8 h.	2,63	2,32	0,33

Cette expérience confirme les expériences précédentes sur le comportement des sucres et des acides aminés vis-à-vis des agents d'hydrolyse. On remarquera que la quantité d'acides volatils oxydés par l'oxyde rouge de mercure est faible dans les distillats provenant des hydrolyses par l'acide paratoluènesulfonique tandis qu'elle est grande dans ceux provenant des hydrolyses par la soude. De plus, la quantité d'acides volatils résistant à l'action de l'oxyde rouge de mercure est constante dans le cas de l'hydrolyse avec l'acide paratoluènesulfonique à 50 p. 100 quand l'hydrolyse est prolongée au delà de quatre

heures ; cette quantité est cependant plus faible que la quantité d'acide correspondant provenant de l'hydrolyse avec la soude N pour une durée de dix-sept heures. Cet écart doit être attribué à l'action de la soude sur les sucres protéidiques, action qui, comme nous l'avons montré, aboutit à la formation d'acides entraînaibles par la vapeur d'eau autres que l'acide lactique et sur lesquels l'oxyde rouge de mercure est sans effet.

CONCLUSIONS.

Cette étude nous permet de conclure que les éléments des protéides et des polyosides placés dans les conditions qui sont celles adoptées par de nombreux auteurs pour doser les acides volatils fixés sur ces dernières substances donnent naissance à des acides volatils qui souillent le distillat. Dans le cas de l'hydrolyse alcaline la quantité d'acides volatils ainsi formés est relativement considérable, de plus une partie non négligeable de ces acides n'est pas détruite par l'oxyde rouge de mercure. Par contre, dans le cas de l'hydrolyse acide, au moyen de l'acide paratoluènesulfonique, la quantité d'acides volatils résultant des réactions secondaires est toujours minime ; de plus ces acides sont entièrement détruits au cours du traitement par l'oxyde rouge de mercure. Ces résultats sont confirmés par l'étude des hydrolysats sériques.

Ainsi nous sommes conduit à employer finalement l'acide paratoluènesulfonique comme agent d'hydrolyse et à rejeter l'emploi de la soude ou de l'acide sulfurique. De plus, nous avons vu que la quantité d'acides volatils libérés par les protéides sériques est maximum quand ces protéides sont traités par l'acide paratoluènesulfonique à 25 p. 100 pendant quatre heures à 160°.

C. — Technique proposée pour le dosage de l'acide acétique lié aux protéides sériques.

Nous nous proposons de décrire dans ce chapitre la technique que nous avons mise au point et qui a été utilisée au cours de ce travail.

Le sérum et les différentes fractions qui ont été obtenues à partir du sérum sont préalablement soumis à la dialyse. De cette façon sont éliminés les sels qui se trouvent normalement dans le sérum ou qui ont été utilisés pour son fractionnement. La présence de certains de ces sels conduirait, en effet, à des résultats erronés. A un volume de sérum dialysé ou d'une solution de l'une de ses fractions on ajoute un volume égal d'une solution à 50 p. 100 d'acide paratoluènesulfonique. L'hydrolyse se fait à volume constant et à 100°. L'hydrolysate est ensuite distillé et le résidu soumis à l'entraînement par la vapeur d'eau jusqu'à épuisement complet. La distillation et les entraînements se font dans le vide de façon à être à l'abri du gaz carbonique de l'air. Nous avons généralement dosé ce premier distillat. Cette liqueur est ensuite traitée par l'oxyde rouge de mercure en présence d'acide sulfurique et de sulfate de magnésie, puis distillée à nouveau. Le second distillat est titré au moyen de la solution N/20 de soude en présence de 1 goutte de solution alcoolique de phénolphthaléine.

Nous avons jugé utile de donner les détails relatifs à la préparation des réactifs utilisés et à la conduite des méthodes employées. Nous décrirons, de plus, l'appareil que nous avons construit pour l'entraînement des acides volatils.

RÉACTIFS UTILISÉS. — Acide paratoluènesulfonique : le produit livré par le commerce sous le nom d' « acide paratoluènesulfonique pur pour analyse » est un produit plus ou moins coloré en brun. De plus, soumise à la distillation sa solution libère des acides volatils en quantité non négligeable. Nous avons donc jugé nécessaire de purifier le produit. L'impureté brune est plus soluble dans l'eau que l'acide paratoluènesulfonique lui-même. En utilisant cette différence de solubilité nous avons pu obtenir après deux cristallisations successives des cristaux incolores d'acide paratoluènesulfonique. Les eaux-mères ont servi à purifier de nouvelles quantités du produit. L'acide paratoluènesulfonique, très hygroscopique, est conservé à l'abri de l'humidité. Un essai à blanc nous a montré que le produit ainsi purifié ne renferme plus d'acides volatils.

SOLUTION DE SOUDE N/20 : on obtient une solution de soude privée de carbonate en dissolvant la soude jusqu'à saturation dans de l'eau distillée. La solution est ensuite refroidie à la glacière. Dans ces conditions le carbonate de sodium, éventuellement présent, précipite. On filtre sur filtre d'Iéna. On dilue rapidement le filtrat avec de l'eau distillée bouillie. On ramène ensuite la solution au titre convenable (39). La solution de soude N/20 est gardée à l'abri du gaz carbonique de l'air. Nous avons également utilisé dans nos dosages des solutions de soude, environ N/20, décarbonatées par addition d'une très faible quantité de baryte. Ces dernières solutions sont gardées sans aucune précaution particulière, elles sont titrées, avant chaque dosage, au moyen d'une solution étalon d'acide sulfurique N/20.

Oxyde rouge de mercure.

Sulfate de magnésie.

Solution d'acide sulfurique à 50 p. 100.

Un essai à blanc nous a prouvé que ces trois réactifs sont dépourvus d'acides entraînaibles par la vapeur d'eau.

DIALYSE. — On dialyse dans des sacs de collodion, sous pression, soit à la glacière contre de l'eau distillée, soit contre l'eau courante. Les solutions soumises à la dialyse sont additionnées de quelques gouttes de toluène.

HYDROLYSE. — L'hydrolyse se fait au bain-marie bouillant, dans des ballons à rodage d'une capacité de 50 cent. cubes environ surmontés de réfrigérants ascendants. Quand l'hydrolyse est terminée, on refroidit le ballon puis on fait couler environ 10 cent. cubes d'eau distillée le long des parois intérieures du réfrigérant. Enfin on retire le ballon et l'hydrolysate est soumis à la distillation.

ENTRAÎNEMENTS DE L'ACIDE ACÉTIQUE. — *Description de l'appareil* : l'appareil que nous avons conçu est constitué d'un premier ballon (A) d'une capacité de 800 cent. cubes. Le col de celui-ci, d'une longueur de 25 centimètres est ter-

(39) W. CLARK. *The Determination of Hydrogen Ions*, 1920, p. 71.

miné par un rodage au-dessous duquel se trouve une tubulure latérale perpendiculaire à l'axe du ballon. Cette tubulure peut être mise en relation avec l'extrémité d'une burette de 50 cent. cubes (B) au moyen d'un caoutchouc à vide. Le ballon (A) plonge dans un bain-marie. Une pièce intermédiaire (C), courbée à angle droit et portant à ses deux extrémités un rodage, permet de réunir le ballon (A) au réfrigérant (D). Sur le côté de l'angle en relation avec le ballon (A)

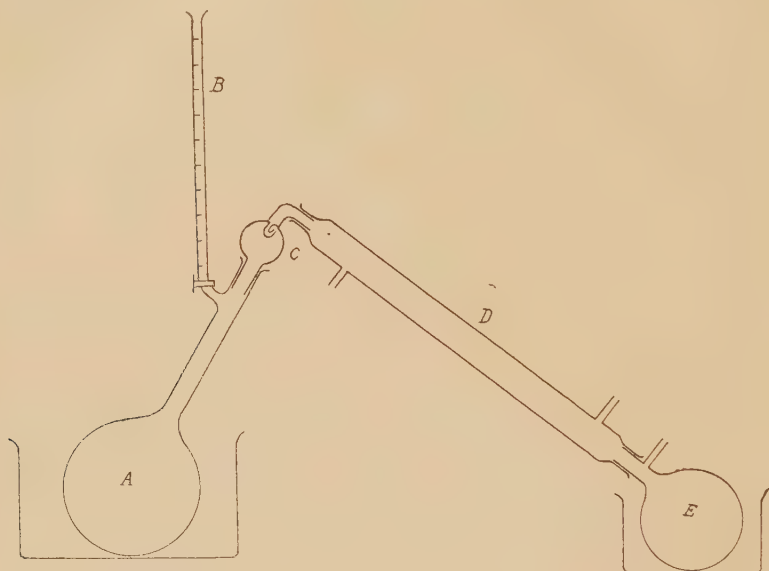


FIG. 1. — Appareil pour l'entraînement des acides par la vapeur d'eau et dans le vide.

la pièce intermédiaire porte un renflement sphérique, limité à sa partie supérieure par une cloison au centre de laquelle se trouve un tube étroit et recourbé. Le passage de la vapeur d'eau du ballon (A) au réfrigérant (D) se fait à travers ce tube. L'extrémité du réfrigérant est terminée par un rodage s'adaptant au rodage du deuxième ballon (E) d'une capacité de 500 cent. cubes. Ce ballon porte une tubulure latérale qui est réunie à une trompe à eau, il plonge dans un cristalliseur rempli d'eau froide (voir fig. 1).

Marche de l'opération : on introduit dans le ballon (A) l'hydrolysate puis un tube capillaire fermé à sa partie supé-

rieure qui agit comme catalyseur de l'ébullition. On réunit le ballon (A) au réfrigérant au moyen de la pièce intermédiaire, puis la burette à la tubulure latérale du ballon (A), enfin le ballon (E) à la trompe à eau. Le bain-marie est porté à la température d'environ 70°. Quand la distillation est commencée on interrompt la communication de l'appareil avec la trompe à eau. On poursuit la distillation jusqu'à ce que le résidu prenne un aspect sirupeux. On ouvre alors le robinet de la burette et on laisse couler le long des parois du ballon (A) 10 cent. cubes d'eau. On pratique dix entraînements successifs, puis on titre le distillat.

L'appareil que nous venons de décrire a l'avantage considérable, du point de vue pratique, de permettre à l'entraînement par la vapeur d'eau de se poursuivre d'une façon continue jusqu'à l'épuisement complet du résidu. De la sorte nous avons réalisé un gain de temps notable, la durée de la distillation a été ainsi réduite à trente minutes environ.

De plus, la longueur du col du ballon (A) ainsi que la particularité du dispositif adopté dans la pièce intermédiaire (C) rend pratiquement impossible la projection de particules de l'hydrolysate acide jusque dans le réfrigérant.

Signalons enfin que la réalisation de notre dispositif ne fait appel qu'à une verrerie courante dans un laboratoire de chimie.

TRAITEMENT PAR L'OXYDE ROUGE DE MERCURE. — Les liqueurs provenant de la distillation, que nous venons de décrire, sont transvasées dans un ballon à rodage de 250 cent. cubes de capacité dans lequel on verse ensuite 0 gr. 50 d'oxyde rouge de mercure, 20 grammes de sulfate de magnésie et 2 cent. cubes d'acide sulfurique à 50 p. 100. On réunit le ballon à un réfrigérant ascendant. On porte le liquide à l'ébullition pendant quinze minutes. Après refroidissement, le distillat ainsi traité est distillé dans le vide. On pratique sur le résidu cinq entraînements successifs après addition de 10 cent. cubes d'eau chaque fois. Dans le distillat final on dose à nouveau les acides volatils.

D. — Caractérisation de l'acide volatil lié aux protéides sériques.

1° ETABLISSEMENT DE LA COURBE D'ENTRAÎNEMENT FRACTIONNÉ PAR LA VAPEUR D'EAU [MÉTHODE DE DUCLAUX] (40).

Un volume de 80 cent. cubes de sérum de cheval est traité suivant la technique indiquée pour le dosage des acides volatils. Le distillat final est concentré à un faible volume après alcalinisation puis distillé en présence d'un excès d'acide sulfurique. Ce dernier distillat, renfermant la totalité des acides volatils libérés par le sérum, est utilisé pour l'établissement de la courbe d'entraînement fractionné par la vapeur d'eau selon la méthode de Duclaux.

Principe de la méthode. — Un volume connu d'une solution diluée d'un acide volatil est placé dans un ballon réuni à un réfrigérant puis est soumis à la distillation. On recueille successivement des volumes égaux de distillat que l'on titre avec une solution alcaline quelconque. Les proportions d'acides volatils contenus dans les portions successives du distillat sont caractéristiques de l'acide volatil employé.

Technique. — L'appareil utilisé est constitué d'un ballon à rodage d'un volume de 500 cent. cubes et d'un réfrigérant à col recourbé. Le col du réfrigérant est terminé par un rodage s'adaptant à celui du ballon.

Nous avons introduit dans le ballon 110 cent. cubes de la solution préalablement titrée (ce volume correspond à 13 c. c. 86 de NaOH N/20) et nous avons conduit la distillation assez rapidement. Le distillat est recueilli dans des tubes jaugés, de 10 cent. cubes chacun, placés dans un portoir qui peut glisser rapidement sous le bec du réfrigérant. On peut ainsi, au cours de la distillation, substituer un tube au suivant sans qu'il y ait perte de liquide. Nous avons utilisé dans nos titrages la solution de NaOH N/20 et, comme réactif, la solution de phénolphthaléine. Les tubes sont rincés avec de l'eau

(40) G. BERTRAND et P. THOMAS. *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, p. 412.

TABLEAU II.

VOLUME du distillat recueilli en centimètres cubes	ACIDITÉ du distillat exprimée en centimètres cubes N/20	ACIDITÉ exprimée en centièmes de l'acidité totale			
		Solution à analyser	Acide acétique	Acide formique	Acide propionique
10.	0,78	5,6	5,9	3,5	11,5
20.	1,62	11,6	12,2	7,2	22,8
30.	2,56	18,4	18,6	11,3	33,5
40.	3,50	25,2	25,6	15,5	44,0
50.	4,50	32,4	32,7	20,2	54,0
60.	5,60	40,4	40,4	25,5	63,3
70.	6,74	48,6	48,7	31,1	72,5
80.	8,00	57,7	57,5	38,5	81,0
90.	9,48	68,6	67,5	48,0	88,5
100.	11,24	81,0	80,0	59,0	95,0

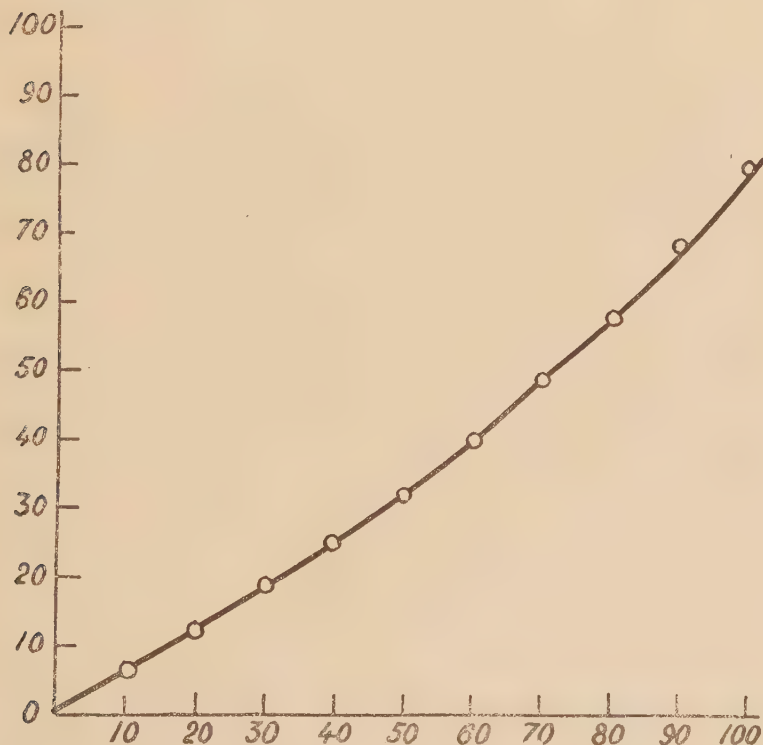


FIG. 2. — Entraînement fractionné par la vapeur d'eau d'une solution d'acide acétique (courbe d'après Duclaux) et d'une solution provenant des distillats sériques (O).

distillée préalablement bouillie et les eaux de rinçage réunies au distillat.

Nous reproduisons dans la deuxième colonne du tableau II les lectures successives faites sur la burette. Les chiffres de la troisième colonne expriment en centièmes les proportions d'acide existant dans les 10, 20, 30, 40, etc..., premiers centimètres cubes du distillat, dans l'hypothèse que l'acidité des 440 cent. cubes de solution introduite dans le ballon correspond à 100 cent. cubes de solution de NaOH N/20. Nous avons fait cette transformation de façon à pouvoir comparer les résultats relatifs à la solution à analyser avec ceux relatifs à l'acide acétique, à l'acide formique et à l'acide propionique obtenus par Duclaux. La figure 2 reproduit la courbe de Duclaux en même temps que les résultats de notre analyse.

2° DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE PARTAGE ENTRE L'ÉTHER ET L'EAU.

Les distillats neutralisés provenant de l'établissement de la courbe de Duclaux sont réunis, concentrés à un faible volume puis distillés après acidification par l'acide sulfurique. On détermine le titre du distillat ainsi obtenu. On verse ensuite dans une ampoule à décanter 20 cent. cubes du distillat et 22 cent. cubes d'éther, on agite à trois reprises, on laisse reposer, on décante soigneusement la phase aqueuse que l'on titre. Les mêmes mesures sont faites sur une solution d'acide acétique de concentration voisine de celle de la solution à étudier. Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau III.

TABLEAU III.

	SOLUTION à analyser	SOLUTION d'acide acétique
Phase aqueuse	3 c. c. 42 N/20	2 c. c. 78 N/20
Phase étherée	1 c. c. 42 N/20	1 c. c. 18 N/20
Coefficient de partage	0,41	0,42

3° DÉTERMINATION DU POIDS DES CENDRES.

Les solutions provenant de la détermination du coefficient de partage sont réunies, concentrées à un faible volume après

alcalinisation par la soude, puis distillées en présence d'un excès d'acide sulfurique. Le distillat est traité ensuite par un excès de carbonate d'argent fraîchement préparé. On filtre. On concentre le filtrat à un faible volume. La solution ainsi obtenue est placée dans un tube de centrifugeuse et est additionnée d'alcool absolu jusqu'à ce qu'une nouvelle addition d'alcool ne précipite plus le liquide surnageant. Le culot de centrifugation est desséché dans le vide jusqu'à poids constant. une partie du culot est pesée dans une capsule de platine puis est soumise à la calcination. Les résultats obtenus sont les suivants :

Poids de la substance avant calcination.	0,065
Poids du résidu après calcination.	0,0425
Teneur en argent du sel d'argent à analyser	65,3 p. 100
Teneur en argent de l'acétate d'argent.	64,6 p. 100

CONCLUSION. — Les mesures ont été faites sur une solution renfermant la totalité des acides volatils liés aux protéides sériques. Les résultats obtenus démontrent qu'il n'y a qu'un seul acide ainsi fixé et que cet acide est l'acide acétique.

E. — Teneur de quelques sérums en acide acétique.

Nous avons appliqué notre technique de dosage de l'acide acétique à l'étude de quelques sérums. Les résultats de nos expériences sont reproduits dans le tableau IV.

D'après les résultats précédents la teneur des protéides sériques en acide acétique varie d'une espèce animale à une autre.

F. — Conclusions.

L'examen des différentes techniques d'hydrolyse adoptées pour le dosage de l'acide acétique et des autres acides volatils fixés sur les protéides et sur les polysides nous a montré que l'emploi des alcalis, comme agents d'hydrolyse, devait être rejeté. Ils détruisent, en effet, les oses dont la présence semble constante dans les protéides, pour former de l'acide

lactique et d'autres acides qui souillent les distillats. De plus, tandis que l'acide lactique est détruit après traitement des distillats par l'oxyde rouge de mercure, les acides accompagnant l'acide lactique et provenant comme lui des réactions secondaires résistent à ce traitement. Pour des raisons semblables, l'acide sulfurique, utilisé par quelques auteurs, ne

TABLEAU IV.

SÉRUM DIALYSÉ SOUMIS A L'HYDROLYSE	EXTRAIT SEC A 110° exprimé en grammes	ACIDE ACÉTIQUE exprimé en centimètres cubes N/20	TENEUR EN ACIDE ACÉTIQUE		
			de 1 gramme de protéide exprimée		de 1 litre de sérum (1) exprimé en grammes
			en centimètres cubes N/20	en milligrammes	
20 cent. cubes sérum humain normal.	1,636	4,96	3,03	9,09	0,780
20 cent. cubes plasma de mouton n° 1	1,3320	2,29	1,72	5,16	0,343
20 cent. cubes plasma de mouton n° 2 (2).	1,1480	1,98	1,72	5,16	0,348
20 cent. cubes sérum de cheval normal.	1,5600	4,66	2,98	8,94	0,720 (3)
20 cent. cubes sérum antidiphthérique à 3.000 unités.	1,7760	4,48	2,54	7,62	0,672
20 cent. cubes sérum antidiphthérique à 7.000 unités.	1,9100	5,27	2,75	8,25	0,750

(1) Cette détermination a été faite en tenant compte de la variation de volume due à la dialyse.
(2) Les deux échantillons de plasma proviennent de deux saignées faites à une semaine d'intervalle, chez le même animal.
(3) Nous tenons à rappeler ici que dans notre premier travail (voir page 21) nous avons trouvé que 1 litre de sérum de cheval libérait 5 cent. cubes d'acide acétique N, soit 0 gr. 30 d'acide acétique. Nous avons fait la critique de ce travail dans les chapitres précédents.

peut être adopté lui non plus dans l'hydrolyse des protéides. Par contre, l'acide paratoluènesulfonique s'est révélé comme un agent d'hydrolyse satisfaisant puisqu'il ne forme pas, à partir des éléments des protéides, des acides entraîna- bles par la vapeur d'eau. Cependant l'acidité des distillats provenant des hydrolysats des protéides sériques par l'acide paratoluène- sulfonique baisse d'environ 10 p. 100 après traitement par la méthode de Friedermann. Ceci résulte de l'élimination du CO², SO² et SH² du fait soit de l'ébullition, soit de l'oxydation mercurique. A partir de ces observations, nous avons mis au

point une technique de dosage que nous avons décrite d'une façon détaillée.

L'acide volatil, fixé sur les protéides sériques a été caractérisé comme étant l'acide acétique. En effet, la courbe d'entraînement fractionné par la vapeur d'eau, le coefficient de partage entre l'éther et l'eau ainsi que la teneur en argent du sel d'argent sont, avec une approximation de 1 p. 100 à 3 p. 100, ceux de l'acide acétique.

Enfin nous avons montré que la teneur en acide acétique des protéides sériques varie selon l'espèce animale à laquelle on s'adresse. Nous avons constaté, de plus, que l'immunisation fait baisser le taux de l'acide acétique des protéides sériques, tout au moins dans le cas observé qui est celui du cheval immunisé contre la diphtérie.

DEUXIÈME PARTIE

DÉTERMINATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA NATURE DE LA LIAISON DE L'ACIDE ACÉTIQUE AVEC LA MOLÉCULE PROTÉIDIQUE

Dans cette partie de notre travail nous nous proposons d'élucider le mode de liaison de l'acide acétique avec le reste de la molécule protéidique en analysant les courbes d'hydrolyse acide et alcaline (*) du sérum et en comparant ces courbes à celles obtenues à partir de composés acétylés dont nous avons fait la synthèse.

A. — Etude des courbes d'hydrolyse du sérum.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES RELATIVES A L'ÉTUDE DES COURBES D'HYDROLYSE.

Les réactions d'hydrolyse en milieu acide sont des réactions pseudo-monomoléculaires, c'est-à-dire qu'elles sont représentées par des équations de même forme que les réactions monomoléculaires vraies mais, tandis que pour ces dernières la constante d'hydrolyse est indépendante de la concentration

(*) Nous venons de voir les raisons pour lesquelles nous avons rejeté l'emploi de la soude comme agent d'hydrolyse dans le dosage de l'acide acétique. Cependant, dans le cas présent, ces arguments perdent de leur importance puisque nous nous proposons de considérer ici moins les valeurs absolues des points de la courbe que leurs valeurs relatives, c'est-à-dire finalement l'allure de la courbe.

initiale, pour les réactions pseudo-monomoléculaires la constante d'hydrolyse (k') est fonction de celle-ci. L'équation des réactions pseudo-monomoléculaires est donc :

$$\ln \frac{c_{\infty}}{c_{\infty} - c} = K't$$

Dans les expériences qui suivent, c représente la quantité d'acide acétique libéré au temps t et c_{∞} la totalité de l'acide acétique fixé sur la substance.

Afin de faciliter l'étude des courbes d'hydrolyse acide (*) nous avons utilisé le papier quadrillé ordinaire sur lequel le temps est porté en abscisse et les valeurs de $\frac{c}{c_{\infty}}$ en ordonnée et le papier semi-logarithmique sur lequel le temps est porté en abscisse et les valeurs de $\ln \frac{c_{\infty}}{c_{\infty} - c}$ en ordonnée.

En ce qui concerne l'hydrolyse alcaline, nous avons jugé suffisant d'étudier les courbes $\frac{c}{c_{\infty}} = f(t)$ tracées sur papier quadrillé ordinaire.

1° COURBE D'HYDROLYSE ACIDE A 100° (SÉRUM N° V) [**]. — Chaque point de la courbe a été obtenu de la façon suivante : dans un ballon à rodage, d'un volume de 50 cent. cubes, contenant 10 cent. cubes de sérum dialysé, on verse 10 cent. cubes d'une solution N d'acide paratoluènesulfonique préalablement porté à 100°. Le ballon est ensuite adapté à un réfrigérant ascendant et plonge jusqu'à la base du col dans un bain-marie à l'ébullition. Au début de l'hydrolyse on a soin d'agiter l'ensemble constitué par le ballon et le réfrigérant afin d'homogénéiser le mélange. L'hydrolyse est arrêtée le plus rapidement possible, pour cela on retire le ballon surmonté du réfrigérant, on le plonge dans l'eau à 0°, tandis qu'on introduit, par l'orifice supérieur du réfrigérant, 10 cent. cubes de solution de soude N. On retire enfin le ballon, on

(*) Toutes les courbes d'hydrolyse acide tracées sur papier semi-logarithmique sont réunies dans un même tableau (voir p. 59).

(**) Le sérum qui a fait l'objet de cette étude est celui du sang de cheval normal.

acidifie l'hydrolysats par addition d'une solution d'acide citrique à 50 p. 100 (*) et on distille dans les conditions déjà indiquées, en prenant soin d'ajouter I ou II gouttes d'alcool octylique secondaire. Les opérations sont ensuite conduites comme il a été indiqué pour le dosage de l'acide acétique.

TABLEAU V. — Hydrolyse acide à 100° (sérum n° 5 :
C ∞ = 2 c. c. 35 N/20).

DURÉE	NaOH N/20 (1) (centimètres cubes)			$\frac{C}{C \infty}$
	1 ^{er} distillat	2 ^e distillat	Différence	
1 h.	0,85	0,80	0,05	0,34
2 h.	1,08	1,03	0,05	0,43
3 h.	1,15	1,05	0,10	0,44
4 h. 15 m. . .	1,50	1,42	0,08	0,60
4 h. 15 m. . .	1,80	1,68	0,12	0,71
5 h. 45 m. . .	2,13	1,99	0,14	0,84
5 h. 45 m. . .	2,15	1,96	0,19	0,83
8 h. 20 m. . .	2,27	2,00	0,27	0,85
8 h. 20 m. . .	2,26	2,13	0,13	0,90

(1) Dans ce tableau, et dans les tableaux qui suivent, les chiffres placés sous la rubrique « 1^{er} distillat » correspondent à l'acidité exprimée en centimètres cubes d'acide N/20, des distillats provenant de l'entraînement par la vapeur d'eau de la totalité des acides volatils contenus dans les hydrolysats et les chiffres placés sous la rubrique « 2^e distillat » expriment la teneur en acides volatils de ces mêmes distillats après qu'ils aient été traités par l'oxyde rouge de mercure.

La teneur du sérum en acide acétique a été déterminée suivant la technique déjà décrite. Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau V.

L'examen de la courbe (voir fig. 3) montre que celle-ci s'infléchit entre les points ayant pour abscisses deux heures et trois heures et que l'on peut situer le centre de l'inflexion au point ayant pour ordonnée $\frac{C}{C \infty} = 0,50$ et pour abscisse $t =$ deux heures trente. Ce point divise donc la courbe en deux portions dont les projections sur l'axe des ordonnées sont sen-

(**) Nous avons préalablement constaté que la solution d'acide citrique à 50 p. 100 ne libère pas d'acide acétique quand elle réagit sur le sérum dans les conditions qui sont celles adoptées pour l'entraînement des acides volatils. De sorte que nous n'avons pas à craindre de voir l'hydrolyse se poursuivre au cours de la distillation de l'acide acétique.

siblement égales mais dont les projections sur l'axe des abscisses sont très différentes (pour la première portion $t - t_0 =$ deux heures trente, pour la seconde portion $t - t_0 >$ six heures).

Des constatations semblables doivent être faites sur la courbe tracée sur papier semi-logarithmique (voir page 59). On obtient, dans ce cas, deux portions de droites décalées l'une par rapport à l'autre et ayant des pentes différentes. Cette discontinuité s'observe entre les points d'abscisses deux heures

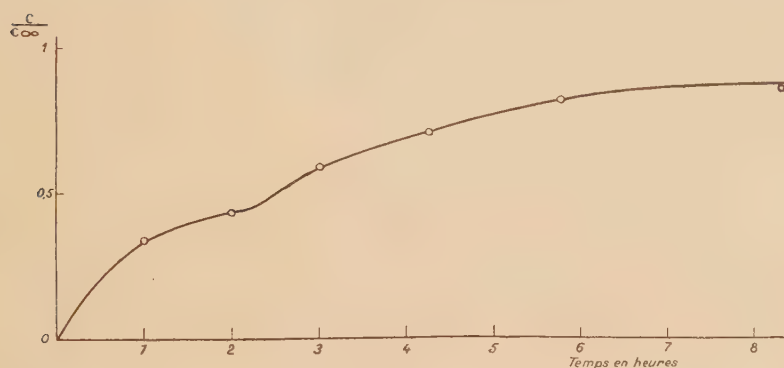


FIG. 3. — Courbe d'hydrolyse acide du sérum à 100°.

et trois heures, c'est-à-dire qu'elle correspond à l'inflexion de la courbe précédente.

2° COURBE D'HYDROLYSE ALCALINE A 100° (SÉRUM N° V). — Cette courbe a été obtenue de la même façon que la courbe précédente sauf que l'on a utilisé la solution de soude N comme agent d'hydrolyse et qu'on a arrêté l'hydrolyse par addition de 10 cent. cubes d'une solution d'acide citrique à 50 p. 100. Le sérum étudié est le même que le précédent. Nous précisons que l'hydrolysât après distillation est entraîné à cinq reprises par addition de 10 cent. cubes d'eau, de sorte que les conditions de distillation et d'entraînement se trouvent être rigoureusement identiques pour chacun des points de la courbe. Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau VI.

TABLEAU VI. — Hydrolyse alcaline à 100° (sérum n° 5 :
C ∞ = 2 c.c. 35 N/20).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)			$\frac{C}{C_{\infty}}$
	1 ^{er} distillat	2 ^e distillat	Différence	
40 m. . .	1,22	0,60	0,62	0,25
1 h. 20 m. . .	1,52	0,83	0,69	0,35
2 h. 30 m. . .	2,20	1,22	0,98	0,51
3 h.	2,50	1,42	1,18	0,60
3 h. 30 m. . .	2,62	1,47	1,15	0,62
4 h.	2,90	1,49	1,41	0,63
5 h.	3,00	1,90	1,10	0,80
7 h. 41 m. . .	4,10	2,20	1,90	0,93

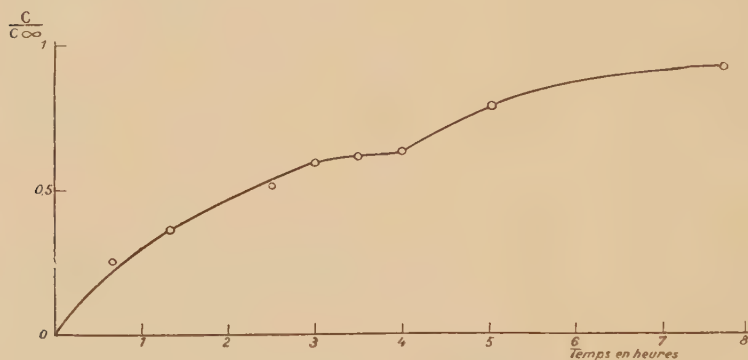


FIG. 4. — Courbe d'hydrolyse alcaline du sérum à 100°.

La courbe de la fig. 4 présente comme fait remarquable l'existence d'un palier horizontal qui s'étend de la troisième à la quatrième heure, le palier a pour ordonnée $\frac{C}{C_{\infty}} = 0,60$ (*). Il divise la courbe en deux portions dont les projections sur l'axe des ordonnées ont des valeurs peu différentes (*) mais dont les projections sur l'axe des abscisses ont des valeurs très inégales (pour la première portion $t - t_0 =$ trois heures ; pour la seconde, $t - t_0 =$ quatre heures quarante et une.

3° COURBE D'HYDROLYSE ALCALINE A 31° (SÉRUM N° III). — Le

(*) En corrigeant la valeur de cette ordonnée, de façon à tenir compte des acides secondaires présents dans ces distillats en même temps que l'acide acétique, on trouve une nouvelle valeur qui est voisine de 0,50.

sérum et la solution N de soude sont versés dans un tube à essai que l'on bouche soigneusement et que l'on place dans un thermostat à 31°. La suite des opérations est identique à celle de l'expérience précédente. Dans la courbe ci-dessous on porte en ordonnée les valeurs de c (on n'a pas déterminé pour ce sérum la valeur de c_{∞}).

Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau VII.

TABLEAU VII. — Hydrolyse alcaline à 31° (sérum n° 3).

DURÉE en jours	NaOH N/20 (centimètres cubes)			C
	1 ^{er} distillat	2 ^e distillat	Différence	
3	1,41	0,70	0,41	0,70
6	1,54	1,06	0,48	1,06
10	1,87	1,09	0,78	1,07
11	1,99	1,13	0,86	1,13
17	3,25	1,43	1,82	1,43

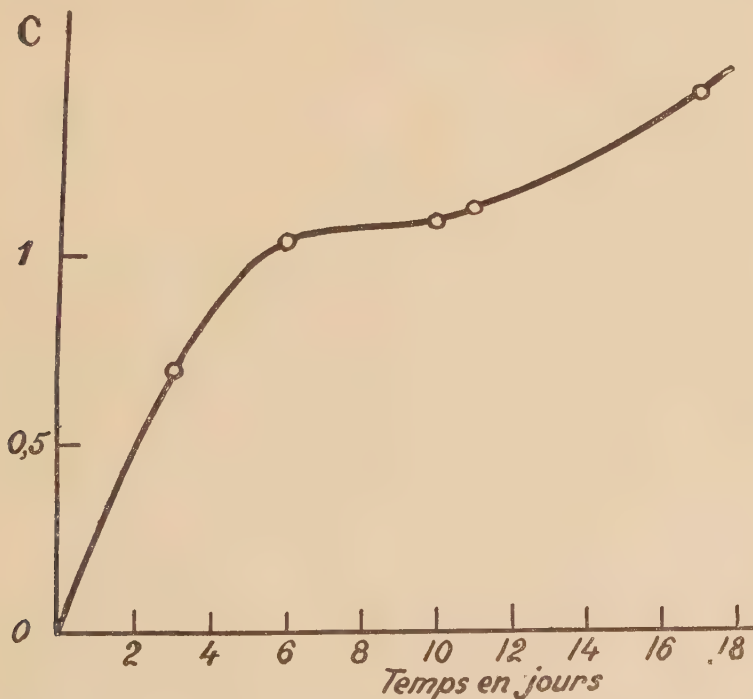


FIG. 5. — Courbe d'hydrolyse alcaline du sérum à 31°.

Cette courbe, comme la courbe précédente, est caractérisée par l'existence d'un palier horizontal, celui-ci s'étend du sixième au onzième jour.

RÉSUMÉ.

Les courbes d'hydrolyse acide et alcaline du sérum s'infléchissent de part et d'autre d'un point dont l'ordonnée a une valeur voisine de $\frac{c}{c_{\infty}} = 0,50$.

La présence de cette inflexion et la valeur de son ordonnée rendent vraisemblables les hypothèses suivantes :

1° Il existerait dans le sérum deux types de groupements acétylés ayant des vitesses d'hydrolyse très différentes (*).

2° La valeur de la constante d'hydrolyse (K') relative au groupement dont la vitesse d'hydrolyse est la plus faible n'est pas constante, elle croîtrait notablement lorsque le groupement dont la vitesse d'hydrolyse est la plus grande est pratiquement totalement hydrolysé.

3° Les deux groupements acétylés existeraient dans le sérum en quantité sensiblement égale. La concentration moléculaire de chacune des deux substances acétylées serait ainsi de $1,2 \frac{N}{200}$ dans le cas du sérum de cheval (voir p. 38).

B. — Etude des courbes d'hydrolyse de quelques substances biologiques acétylées.

Ces courbes ont été obtenues à partir de l'acétylglucosamine et de trois acides aminés acétylés : l'acétylglycocolle, l'acétylproline et la diacétylcystéine.

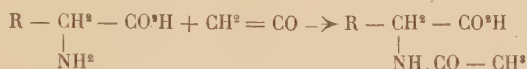
PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ACÉTYLATION AU MOYEN DU CÉTÈNE.

Les dérivés acétylés qui font l'objet de cette étude ont été obtenus par acétylation au moyen du cétène. On sait que le

(*) La vitesse d'hydrolyse variant en fonction du temps, il est nécessaire d'envisager les valeurs des vitesses au même instant t , quand on compare entre elles les vitesses d'hydrolyse des groupements acétylés.

cétène donne des produits d'addition avec les alcools, les phénols, les thiols, les amines, etc. Ces réactions se font d'ailleurs avec des vitesses très différentes. C'est ainsi, en particulier, que le kétène se combine beaucoup plus rapidement avec les fonctions amines qu'avec les fonctions alcools.

Dans le cas des acides aminés, le kétène réagit suivant la formule



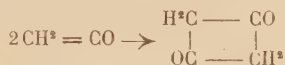
Le kétène lui-même est obtenu par pyrogénéation de l'acétone, à la température de 500° à 600°.



A température plus élevée, le kétène se décompose à son tour



et, à la température ordinaire, il se polymérise pour donner le dicétocyclobutane



Ces réactions sont à la base de la technique d'acétylation mise au point par Bergmann (41) dans un travail sur l'acétylation des acides aminés et des peptides, puis adoptée, après quelques modifications par Herriot et Northrop pour l'acétylation de la pepsine cristallisée, par Stern et White (42) pour l'acétylation de l'insuline, par Velluz (43) qui a étudié les propriétés des toxines diphtérique et tétanique après acétylation, par Goldie et Sandor (44) dans leurs travaux sur l'acétylation du sérum antitétanique.

L'appareil que nous avons utilisé est celui proposé par Herriot (45). Le filament de tungstène a un diamètre de 5/100

(41) BERGMANN et STERN. *Ber. chem. Ges.*, **63**, 1930, p. 437.

(42) STERN et WHITE. *Journ. of biol. Chem.*, **122**, 1938, p. 371.

(43) VELLUZ. *Bull. Soc. chim. biol.*, **18**, 1936, p. 1716 et *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 35.

(44) GOLDIE et SANDOR. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1530.

(45) On trouvera la description de l'appareil utilisé par Herriot puis par nous-mêmes dans : *Journ. Gen. Phys.*, **18**, 1935, p. 69.

de millimètre et une longueur de 46 centimètres environ, l'intensité du courant qui le traverse est de 1 ampère. Ces conditions sont celles déterminées par Sandor et Goldie (46). Elles doivent être scrupuleusement observées pour que l'acétylation ait lieu avec une vitesse convenable.

L'acétylation, elle-même, est conduite comme suit : on verse dans un ballon de 500 cent. cubes, contenant quelques fragments de porcelaine poreuse, environ 300 cent. cubes d'acétone pure du commerce. On porte à l'ébullition et l'on prolonge celle-ci assez longtemps pour que l'air soit complètement chassée. A ce moment on branche le courant sur le filament de tungstène. La durée de l'acétylation sera précisée pour chacune des substances étudiées.

ÉTUDE DE LA N ACÉTYLGLUCOSAMINE.

SYNTHÈSE DE LA N ACÉTYLGLUCOSAMINE. — *Principe* : Le dérivé N acétylé de la glucosamine a été obtenu par F. Zuckerkandl et L. Messiner-Klebermass (47) en faisant réagir la glucosamine sur l'anhydride acétique en présence d'alcool méthylique.

Nous avons pensé qu'il était possible de préparer ce même composé par action du cétène sur la glucosamine en solution aqueuse. Nous savons, en effet, que dans ces conditions les groupements acétylés se fixent uniquement sur la fonction amine et que les fonctions alcools restent inaltérées.

Cependant, nous avons rencontré, au cours de la mise au point de notre technique, quelques difficultés que nous nous proposons d'exposer ici.

De nombreux essais nous ont montré qu'il n'est pas possible d'obtenir une acétylation complète de la glucosamine en solution aqueuse même si l'action du cétène est prolongée pendant plusieurs heures. En effet, la vitesse d'acétylation qui est grande au début de la réaction se ralentit rapidement et l'on constate qu'elle devient sensiblement nulle après une heure.

(46) SANDOR et GOLDIE. *Bull. Soc. chim. biol.*, **20**, 1938, p. 1130.

(47) ZUCKERKANDL et MESSINER-KLEBERMASS. *Biochem. Z.*, **236**, 1931, p. 19.

Nous avons pensé que le phénomène inhibiteur que l'on observe est dû à la grande quantité d'acide acétique qui se forme au cours de la réaction.

Nous rappelons d'ailleurs que Herriot et Northrop (48) ont rencontré une difficulté semblable au cours de leurs travaux sur l'acétylation de la pepsine. Ces auteurs ont été conduits à éliminer, par dialyse, l'acide acétique afin de pouvoir poursuivre plus loin l'acétylation de la pepsine.

Dans la technique que nous proposons le principe est le même, cependant l'acide acétique formé est éliminé par entraînement par la vapeur d'eau.

Nous pensons que dans nos expériences sur l'acétylation de la glucosamine, comme dans celles de Herriot et Northrop sur l'acétylation de la pepsine, l'acide acétique formé au cours de l'acétylation agit sur les fonctions susceptibles de s'acétyler en modifiant leur degré d'ionisation.

Technique : La technique adoptée est la suivante : le chlorhydrate de glucosamine (4 gr. 453) est dissous dans de l'eau distillée (environ 60 cent. cubes), on ajoute à cette solution un poids d'acétate d'argent équivalant à celui du chlorhydrate de glucosamine (3 gr. 4483). Il se forme un précipité de chlorure d'argent.

On fait passer pendant une heure le courant de cétène à travers le liquide surnageant le précipité de chlorure d'argent. On filtre, on lave le précipité de chlorure d'argent, on complète le filtrat à un volume connu (250 cent. cubes) et sur une partie aliquote (1,5 cent. cube) on dose par la méthode de Van Slyke l'azote aminé libre (0,73 cent. cube). Après une heure d'acétylation le rendement en N-acétylglucosamine est donc de 77 p. 100.

Le reste de la solution est évaporé à sec par distillation dans le vide. Le résidu est dissous dans de l'eau distillée (environ 100 cent. cubes) et la solution est à nouveau évaporée à sec à pression réduite. De cette façon, nous avons éliminé la presque totalité de l'acide acétique formé au cours de l'acétylation.

Le résidu est dissous dans de l'eau distillée (50 cent. cubes)

(48) HERRIOT et NORTHROP. *Journ. of gen. Physiol.*, 18, 1935, p. 36.

et la solution est de nouveau soumise à l'action de cétène pendant une heure, puis on détermine comme précédemment la teneur en azote aminé libre et le pourcentage de glucosamine acétylée (98 p. 100). Dans ces conditions, l'acétylation de la glucosamine est donc pratiquement complète.

La N-acétylglucosamine a été isolée et purifiée de la façon suivante : la solution est évaporée à pression réduite. On soumet le résidu à deux nouveaux entraînements par la vapeur d'eau de façon à éliminer l'acide acétique. Le résidu est épuisé par l'alcool méthylique chaud, dans un appareil de Kumagawa. L'acétylglucosamine relativement peu soluble forme des lamelles blanches, l'alcool méthylique surnageant est teinté en brun. Les cristaux d'acétylglucosamine sont soumis à une nouvelle purification par un traitement identique à celui qui vient d'être décrit. Les cristaux sont enfin desséchés dans le vide phosphorique.

COURBES D'HYDROLYSE DE LA N ACÉTYLGLUCOSAMINE.

Nous avons préparé, à partir de ces cristaux, une solution de N-acétylglucosamine sensiblement N/200 (*). Cette solution a été utilisée pour le tracé des courbes d'hydrolyse acide et alcaline (voir tableaux VII et IX et fig. 6). Au préalable, nous avons vérifié qu'elle ne renfermait plus d'acide acétique libre.

Dans le cas de l'hydrolyse acide nous n'avons pas pu déceler dans les distillats la présence d'acides entraînaibles autres que l'acide acétique. Par contre, les distillats provenant des hydrolyses alcalines ont été traités suivant la méthode de Friedermann. Nous avons donné les valeurs trouvées avant et après le traitement des distillats par l'oxyde rouge de mercure et nous voyons que l'écart est notable. Les valeurs maxima fournies par l'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline sont

(*) La valeur K' des équations des réactions d'hydrolyse est fonction de la concentration initiale. La concentration moléculaire de l'acide acétique provenant de chacun des deux groupements acétylés du sérum est assez voisine de N/200 (voir p. 46). Nous avons donc choisi, pour l'établissement des différentes courbes qui doivent être comparées aux courbes d'hydrolyse des groupements acétylés du sérum, des solutions N/200 dans le cas de l'acétylglucosamine, de l'acétylglycocolle et de l'acétylproline et une solution N/100 dans le cas de la diacétylcystéine.

TABEAU VIII. — Hydrolyse acide de l'acétylglucosamine ($C_{\infty} = 1,26$).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
30 m.	0,38	0,30
1 h.	0,70	0,55
3 h.	1,15	0,91
3 h. 45 m.	1,22	0,96
4 h. 30 m.	1,26	1,00

TABEAU IX. — Hydrolyse alcaline de l'acétylglucosamine
($C_{\infty} = 1,30$).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)		$\frac{C}{C_{\infty}}$
	1 ^{er} distillat	2 ^e distillat	
30 m.	1,11	0,79	0,60
1 h.	1,32	0,95	0,73
1 h. 30 m.	1,40	1,06	0,81
3 h.	1,55	1,21	0,93
4 h. 30 m.	1,69	1,30	1,00
6 h.	1,71	1,30	1,00

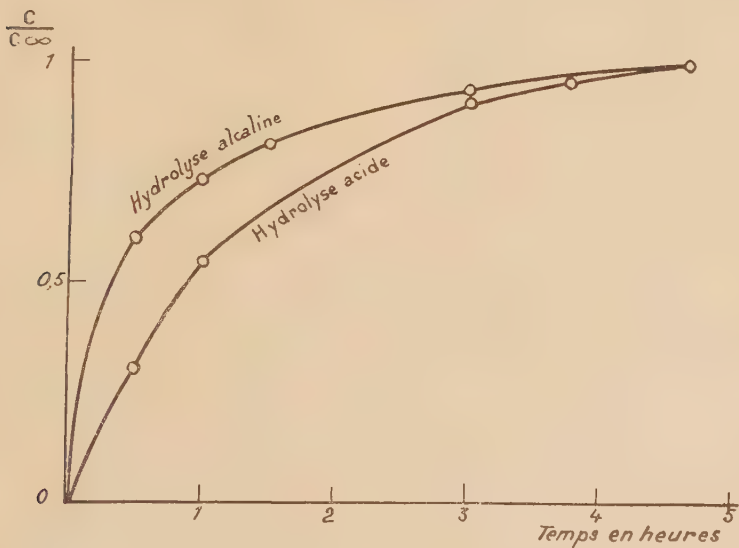


FIG. 6. — Courbes d'hydrolyse alcaline et acide de l'acétylglucosamine

voisines, la valeur fournie par l'hydrolyse alcaline étant la plus forte. Ces constatations sont conformes aux conclusions de la première partie de ce travail.

ÉTUDE DE L'ACÉTYLGLYCOCOLLE.

SYNTHÈSE DE L'ACÉTYLGLYCOCOLLE. — Nous avons obtenu l'acétylglycocolle en soumettant à l'action du cétène 30 cent. cubes d'une solution renfermant 1 gr. 974 de glycocolle. La durée de l'acétylation est d'une heure quarante minutes. Dans ces conditions, l'acétylation est complète ; en effet, la solution ainsi traitée ne libère plus d'azote sous l'action de l'acide nitreux (réaction de Van Slyke).

La solution d'acétylglycocolle a été évaporée à sec par ébullition sous pression réduite. Le résidu a été mis en solution dans environ 100 cent. cubes d'eau et la nouvelle solution a été de nouveau évaporée dans le vide. Ces mêmes opérations ont été répétées une troisième fois de façon à éliminer complètement l'acide acétique résultant de l'action du cétène sur l'eau. Le résidu final a été mis en solution dans le minimum d'eau chaude. Par refroidissement, il se dépose des cristaux d'acétylglycocolle. On recueille les cristaux après décantation. Ces cristaux sont desséchés dans le vide phosphorique.

COURBES D'HYDROLYSE DE L'ACÉTYLGLYCOCOLLE. — A partir de de ces cristaux, nous avons préparé une solution d'acétylglycocolle N/200. Cette solution nous a servi à tracer les courbes d'hydrolyse acide et alcaline relative à l'acétylglycocolle (voir tableaux X et XI et fig. 7). Nous avons vérifié, au préalable, que cette solution ne renfermait pas d'acide acétique libre ; d'une part, en distillant dans les conditions habituelles 10 cent. cubes de cette solution, d'autre part, en dosant l'acidité de cette solution (*). [Nous avons trouvé que 10 cent. cubes de cette solution correspondent à 4 c. c. 01 d'acide N/20.]

(*) En effet, on a transformé du fait de l'acétylation la fonction amine basique en fonction acétamide. Ainsi la fonction carboxylique peut être titrée par la soude.

TABLEAU X. — Hydrolyse acide de l'acétylglycocolle ($C_{\infty} = 1,05$).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
1 h.	0,455	0,42
2 h.	0,70	0,66
3 h.	0,83	0,79
4 h. 30 m.	0,91	0,86
6 h.	1,00	0,95
8 h.	1,05	1,00

TABLEAU XI. — Hydrolyse alcaline de l'acétylglycocolle ($C_{\infty} = 1,08$).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
15 m. 30 s.	0,18	0,16
30 m.	0,34	0,31
53 m. 30 s.	0,47	0,43
1 h 17 m.	0,63	0,58
2 h. 6 m.	0,90	0,83
2 h. 30 m.	0,98	0,90
3 h. 30 m.	1,08	1,00

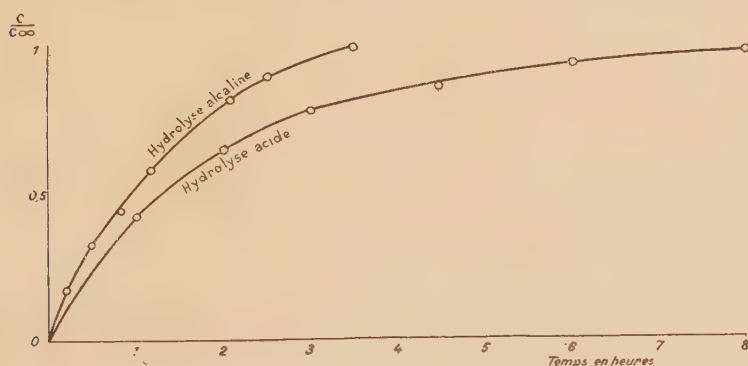


FIG. 7. — Courbes d'hydrolyse alcaline et acide de l'acétylglycocolle.

ÉTUDE DE L'ACÉTYLPROLINE.

SYNTHÈSE DE L'ACÉTYLPROLINE. — La technique est celle proposée par A. Neuberger (49) : un poids de 0 gr. 7610 de

(49) NEUBERGER. *Biochem. J.*, **32**, 1938, p. 1452.

proline est dissous dans 30 cent. cubes de soude N, cette solution est soumise pendant une heure à l'action du cétène. Après acétylation, on ajoute à la solution 30 cent. cubes d'acide sulfurique et on évapore à sec par ébullition sous pression réduite. Le résidu est traité par l'alcool absolu. La solution alcoolique est filtrée, puis évaporée à sec. On obtient ainsi un résidu d'aspect huileux que l'on dissout dans de l'acétate d'éthyle. On précipite cette solution par addition d'éther de pétrole léger, on obtient ainsi un précipité cristallin qu'on dissout dans du chloroforme. On sépare à nouveau l'acétylproline par addition d'éther de pétrole léger à sa solution chloroformique. Les cristaux, ainsi obtenus, sont desséchés dans le vide phosphorique jusqu'à poids constant. Le poids de fusion de ces cristaux est de 119° ; les points de fusion de l'acétylproline trouvés par les auteurs sont de 115° et 117° .

COURBES D'HYDROLYSE DE L'ACÉTYLPROLINE. — Ces courbes (voir tableaux XII et XIII et fig. 8) ont été obtenues à partir d'une solution sensiblement N/200 (10 cent. cubes de cette solution correspondent à 1 c. c. 07 d'acide N/20). On a vérifié préalablement que cette solution était dépourvue d'acide acétique libre.

ETUDE DE LA DIACÉTYLCYSTÉINE.

SYNTHÈSE DE LA DIACÉTYLCYSTÉINE. — Pour la préparation de ce composé nous avons suivi la technique proposée par Neuberger (49).

On dissout 1 gramme de dichlorhydrate de cystéine (produit Hoffman Laroche) dans 25 cent. cubes d'eau contenant une quantité de soude égale à trois fois l'équivalent de cystéine employée, puis la solution est soumise à l'action du cétène pendant une heure. La solution ainsi traitée est additionnée de trois équivalents d'acide sulfurique, elle est soumise ensuite à des extractions répétées par de l'acétate d'éthyle. Les liquides d'extraction sont réunis, réduits à consistance sirupeuse par distillation sous pression réduite puis évaporés dans le vide sulfurique. Le résidu est dissous dans la plus petite quantité possible d'acétate d'éthyle; à cette solution on ajoute de l'éther de pétrole et on abandonne à la glacière. Il se forme

TABLEAU XII. — Hydrolyse acide de l'acétylproline ($C_{\infty} = 1,07$).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
1 h.	0,22	0,20
2 h.	0,40	0,37
3 h.	0,52	0,48
4 h. 30 m.	0,64	0,59
6 h.	0,79	0,73
7 h. 50 m.	0,85	0,79

TABLEAU XIII. — Hydrolyse alcaline de l'acétylproline ($C_{\infty} = 1,07$).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
1 h.	0,11	0,10
4 h.	0,19	0,18
8 h.	0,22	0,20

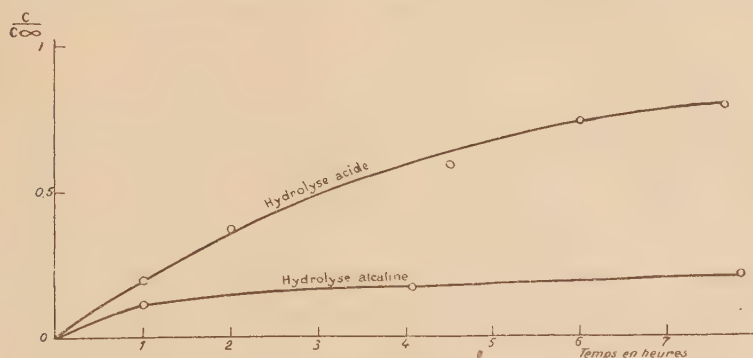


FIG. 8. — Courbe d'hydrolyse alcaline et acide de l'acétylproline.

ainsi des cristaux qui sont recueillis et dissous dans 10 cent. cubes d'acétate d'éthyle. Par addition d'un excès d'éther de pétrole à la nouvelle solution on réalise une recrystallisation du produit. Les cristaux sont desséchés dans le vide phosphorique. Nous avons obtenu un produit blanc, cristallisé, dont le point de fusion au bloc Maquenne est de 109° à 110° .

COURBES D'HYDROLYSE DE LA DIACÉTYLCYSTÉINE. — La solu-

tion qui nous a servi à établir les courbes d'hydrolyse acide et alcaline de la diacétylcystéine (voir tableaux XIV et XV et fig. 9) a été obtenue en dissolvant 0 gr. 480 du produit cristallisé dans 180 cent. cubes d'eau distillée.

Les distillats provenant des hydrolyses acide et alcaline ont été traités par la méthode de Friedermann puis distillés à nouveau. Nous n'avons mentionné, dans les tableaux XIV et XV, que les chiffres relatifs aux dosages des « deuxièmes distillats ».

Nous avons déterminé le taux d'acide acétique fixé sur la cystéine en hydrolysant 10 cent. cubes de la solution par 10 cent. cubes de la solution à 50 p. 100 d'acide paratoluène-sulfonique pendant quatre heures à 100°. Nous trouvons ainsi que 10 cent. cubes de la solution renferment 2 c. c. 21 d'acide acétique N/20 fixé sur la cystéine, le chiffre théorique est de 2 c. c. 19. Ainsi l'acide acétique contenu dans chacun des deux groupements acétylés de la diacétylcystéine se trouve dans la solution à une concentration sensiblement N/200.

RÉSUMÉ.

Les diverses fonctions acétylées libèrent l'acide acétique avec des vitesses très sensiblement différentes.

Dans les conditions dans lesquelles nous nous sommes placé, le groupement acétylthiol est hydrolysé en quelques minutes (*) tandis que les groupements acétamides exigent plusieurs heures pour s'hydrolyser quantitativement.

Dans la catégorie des acétamides, l'acétylproline se distingue très nettement de l'ensemble des acétamides monosubstituées (acétylglucosamine, acétylglycocolle et diacétylcystéine) par sa vitesse d'hydrolyse considérablement plus faible.

D'ailleurs¹ les vitesses d'hydrolyse des acétamides monosubstituées présentent entre elles des écarts sensibles, la structure de l'ensemble de la molécule intervenant d'une façon manifeste dans la vitesse d'hydrolyse.

(*) On sait que les esters acétiques des alcools s'hydrolysent, eux aussi, très rapidement.

TABLEAU XIV. — Hydrolyse acide de la diacétylcystéine
[C ∞ = 2,21] (1).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
	2 ^e distillat	
15 m.	0,89	0,40
1 h.. . . .	1,77	0,80
2 h.. . . .	1,97	0,89
4 h. 47 m.	2,13	0,96
6 h.. . . .	2,21	1

(1) On remarquera sur le graphique de la page 59 que ces valeurs reproduites sur papier semi-logarithmique ne sont pas distribuées sur une droite mais sur une courbe de grand rayon de courbure. La réaction finale n'est donc pas la somme de deux réactions monomoléculaires. Il est fort probable que la valeur de la constante d'hydrolyse K' relative au groupement acétamide varie, au cours de l'hydrolyse, du fait de l'hydrolyse du radical acétylé fixé sur la fonction thiol et de la destruction de cette même fonction thiol.

TABLEAU XV. — Hydrolyse alcaline de la diacétylcystéine
(C ∞ = 2,21).

DURÉE	NaOH N/20 (centimètres cubes)	$\frac{C}{C_{\infty}}$
	2 ^e distillat	
15 m.	1,21	0,54
1 h.. . . .	1,27	0,57
2 h.. . . .	1,41	0,63
3 h.. . . .	1,61	0,72
4 h.. . . .	1,69	0,76
5 h.. . . .	1,81	0,81
6 h.. . . .	1,87	0,84
8 h. 15 m.. . . .	2,01	0,90

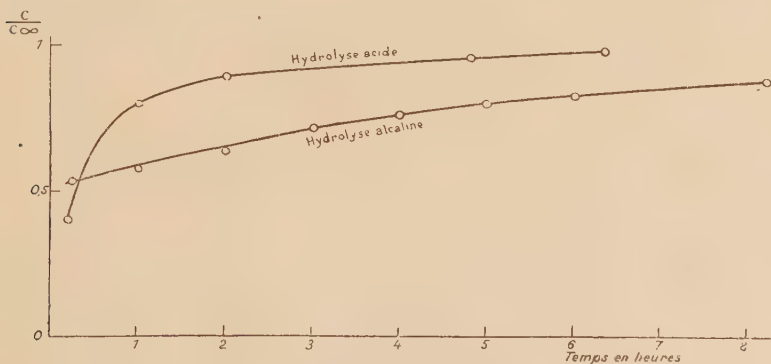


Fig. 9. — Courbe d'hydrolyse alcaline et acide de la diacétylcystéine.

C. — Etude comparative des courbes d'hydrolyse du sérum et des composés précédemment étudiés.

Nous avons vu que les courbes d'hydrolyse du sérum sont constituées de deux parties distinctes et nous avons émis les hypothèses qui paraissent justifier l'allure particulière de ces courbes (voir page 46).

D'après ces hypothèses, la première partie de la courbe résulterait de la superposition des courbes d'hydrolyse de deux réactions dont l'une a une vitesse beaucoup plus grande que l'autre. La première partie de la courbe doit donc être assez semblable à la courbe d'hydrolyse du groupement acétylé dont la vitesse d'hydrolyse est la plus grande (premier groupement).

La comparaison de la première partie de la courbe avec les courbes d'hydrolyse des composés acétylés que nous venons d'étudier prouve que le premier groupement ne peut pas être un ester alcoolique ou thiolique, mais qu'il s'agit bien d'une acétamide. En effet, nous voyons, d'une part, que la durée d'hydrolyse alcaline de ce groupement est de trois à quatre heures, soit sensiblement la même que celle de l'acétylglucosamine et de l'acétylglycocolle et d'autre part que la pente de la droite OA_1 (*), représentant en première approximation l'hydrolyse acide de ce groupement (voir fig. 10 et p. 59), est voisine de celle des droites représentant l'hydrolyse acide des acétamides.

De plus, nous pouvons remarquer sur la figure 10 que OA_1 a une pente assez voisine et légèrement supérieure à celle de la droite représentant l'hydrolyse de l'acétylglucosamine. En tenant compte de ce qui a été dit dans la remarque ci-dessus,

(*) OA_1 est obtenu, à partir de la première partie de la courbe d'hydrolyse acide du sérum (voir fig. 10), en substituant, dans l'équation $y = \ln \frac{c_\infty}{c_\infty - c}$ (voir p. 41), $c \propto \text{par } \frac{c_\infty}{2}$. OA_1 représenterait ainsi l'hydrolyse du premier groupement si celui-ci existait en quantité égale à celle du second groupement et si la vitesse d'hydrolyse de ce dernier était nulle au cours de l'hydrolyse du premier groupement. Or, cette vitesse tout en étant faible n'est pas nulle. Donc la droite qui représenterait, en fait, l'hydrolyse du premier groupement devrait avoir une pente légèrement plus faible que celle de OA_1 .

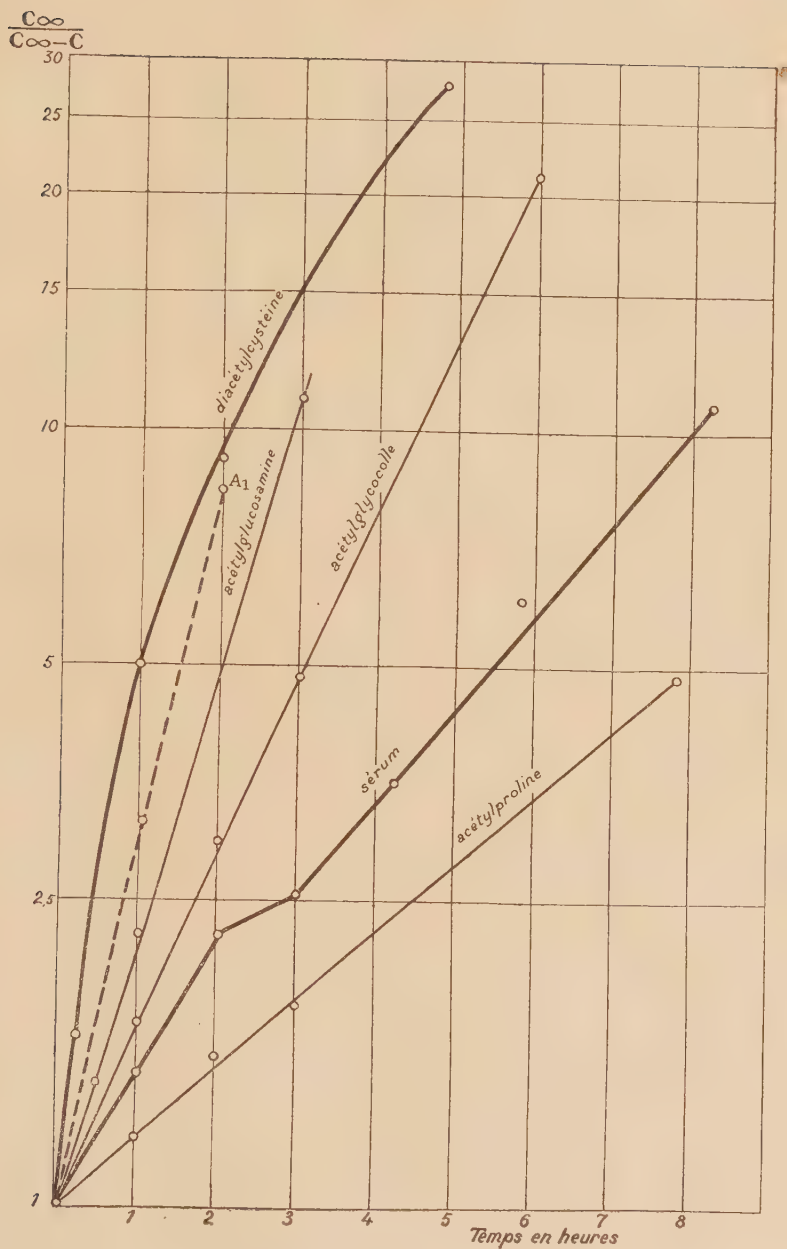


FIG. 10. — Courbes d'hydrolyse acide du sérum et de différentes substances acétylées.

on voit ainsi que la droite représentant l'hydrolyse du premier groupement acétylé du sérum et celle caractéristique de l'hydrolyse de l'acétylglucosamine ont des pentes très voisines.

La durée d'hydrolyse complète du second groupement est plus grande que celle des acétamides monosubstituées que nous avons étudiées mais sensiblement plus petite que celle de l'acétylproline. Ajoutons, enfin, que la variation de la valeur de la constante d'hydrolyse K relative à ce groupement (voir p. 46) pourrait être en rapport avec les modifications subies par le protéide au cours de l'hydrolyse. Ce phénomène présenterait des analogies avec celui que nous avons observé à propos de la diacétylcystéine (voir remarque 1 p. 57).

En résumé, nous pouvons admettre qu'il existe dans le sérum deux types de groupements acétylés, tous les deux sont des acétamides. L'un est très probablement l'acétamide de la glucosamine, la nature exacte de l'autre n'a pas pu être déterminée.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE ANALYTIQUE DES DIFFÉRENTES

FRACTIONS SÉRIQUES

(DÉTERMINATION DU RAPPORT MOLÉCULAIRE

$$\frac{\text{ACIDE ACÉTIQUE}}{\text{GLUCOSAMINE}})$$

Dans l'exposé historique, nous avons vu qu'il paraît exister une relation entre la présence des oses aminés et celle de l'acide acétique lié aux différents osides. Aussi nous semble-t-il digne d'intérêt d'étudier la distribution de l'acide acétique parmi les différentes fractions protéidiques du sérum et de déterminer parallèlement la teneur en glucosamine de ces mêmes fractions.

Nous commencerons l'exposé en décrivant la technique que nous avons adoptée pour le dosage de la glucosamine.

A. — Technique de dosage de la glucosamine.

I. — EXPOSÉ CRITIQUE DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE.

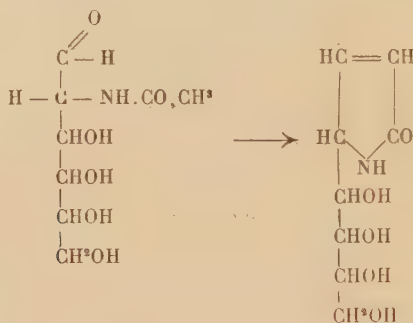
MÉTHODE DE ZUCKERKANDL ET MESSIMER-KLEBERMASS (50). —
Principe de la méthode : Muller (51) a observé que la solution de pentacétylglucosamine préalablement chauffée avec une

(50) ZUCKERKANDL et MESSIMER-KLEBERMASS. *Biochem. Z.*, **236**, 1931, p. 19.

(51) MÜLLER. *Z. Biol.*, **42**, 1901, p. 564.

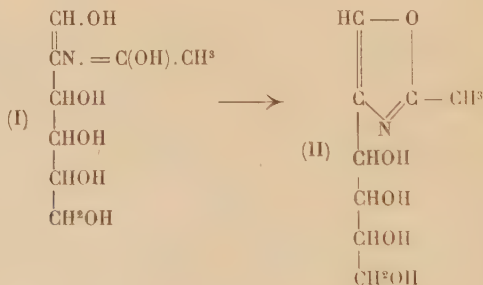
solution de potasse, développe une coloration rouge intense après addition d'une solution de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde acidifiée avec de l'acide chlorhydrique (réactif d'Ehrlich). La coloration ainsi obtenue permet le dosage colorimétrique de l'acétylglucosamine.

Zuckermandl et Messimer-Klebermass ont suggéré que lorsque la N-acétylglucosamine est chauffée avec un alcali dilué les groupes aldéhyde et acétyle réagissent ensemble et qu'on aboutit ainsi à un dérivé du pyrrol.



Ce dernier dérivé se condensant avec la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde, développerait la coloration rouge caractéristique que donnent les dérivés du pyrrol avec le réactif d'Ehrlich.

Cependant pour Morgan et Elson (52) les choses ne se passeraient pas ainsi. La N-acétylglucosamine réagirait sous sa forme énolique (I) et donnerait, par perte d'eau, un dérivé de l'oxazol (II).



Technique : La glucosamine base, libérée du chlorhydrate

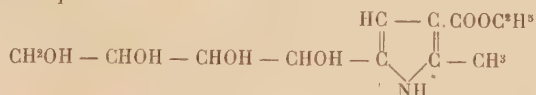
(52) MORGAN et ELSON. *Biochem. J.*, **28**, 1934, p. 988.

de glucosamine, est acétylée prudemment au moyen de l'anhydride acétique. La N-acétylglucosamine ainsi formée est dissoute dans l'alcool à 60 p. 100 et la solution, après addition de 11 gouttes de lessive de soude à 30 p. 100, est portée à l'ébullition pendant six à huit secondes, puis elle est rapidement refroidie. La solution ainsi obtenue donne avec le réactif d'Ehrlich la coloration rouge caractéristique.

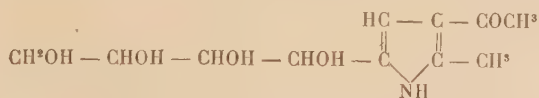
Critique de la méthode : Morgan et Elson ont démontré que cette technique n'est pas satisfaisante d'une part parce que l'acétylation ainsi réalisée n'est pas quantitative, d'autre part parce que l'ébullition, pendant six à huit secondes du dérivé acétylé en solution alcoolique en présence de la lessive de soude à 30 p. 100, aboutit à la destruction partielle de la substance. L'erreur serait supérieure à 6 p. 100.

MÉTHODE DE ELSON ET MORGAN (53). — La méthode proposée par Zuckerkandl et Messimer-Klebermass n'a été adoptée que par de rares auteurs (54). Elson et Morgan ont proposé à leur tour une nouvelle méthode qui a servi de point de départ à l'élaboration des techniques actuellement utilisées. Le principe de la méthode repose sur une réaction décrite par Pauly et Ludwig (55) : la transformation de la glucosamine en dérivé (I) par l'action de l'acétylacétate d'éthyle et en dérivé (II) par l'action de l'acétylacétone.

I : Ester éthylique de l'acide 2 méthyl 5 tétrahydroxybutylpyrrolcarbonique



II : 2 méthyl 3 acétyl 5 tétrahydroxybutylpyrrol



Ces composés se forment au cours de l'ébullition des solu-

(53) ELSON et MORGAN. *Biochem. J.*, **27**, 1933, p. 1824.

(54) KAWABE. *J. Biochem. Japan*, **19**, 1934, p. 319.

(55) PAULY et LUDWIG. *Z. physiol. Chem.*, **424**, 1922, p. 170.

tions alcalines de chlorhydrate de glucosamine soit avec l'acétylacétate d'éthyle, soit avec l'acétylacétone. Ces solutions traitées, après refroidissement, par le réactif d'Ehrlich en présence d'alcool, donnent une coloration rouge stable. La coloration obtenue avec l'acétylacétone est la plus stable, elle a été adoptée par les auteurs.

Nous ne nous proposons pas de décrire la technique d'Elson et Morgan parce qu'elle est très sensiblement la même que celle proposée, plus tard, par Palmer, Smyth et Meyer et que cette dernière technique a été adoptée dans ce travail et sera décrite en détail dans le chapitre qui suit. Cependant nous mentionnerons ici les résultats de l'étude d'Elson et Morgan sur le comportement de diverses substances au cours du dosage de la glucosamine.

On a essayé le glucose, le galactose, le fructose, l'arabinose, d'une part, d'autre part le glycolle, l'alanine, l'histidine ; ces substances n'apportent aucune perturbation au dosage.

Par contre, la méthode ne peut pas être utilisée quand certains dérivés du pyrrol et de l'indol sont présents dans les solutions. Ces substances sont d'ailleurs faciles à déceler puisqu'elles réagissent directement sur le réactif d'Ehrlich sans qu'il soit nécessaire de les traiter par les solutions alcalines d'acétylacétone. La N-acétylglucosamine et la N-acétylchondrosamine, si elles sont présentes, fournissent également avec le réactif d'Ehrlich une coloration rouge pourpre, mais seulement après chauffage avec une solution alcaline, cette coloration serait d'ailleurs due, comme nous l'avons déjà dit, à la formation d'un oxazol substitué.

Le I-aminoglucose se condense avec l'acétylacétone dans les mêmes conditions que la glucosamine et donne par la suite la même coloration ; cependant on ne rencontrerait pas cette substance dans les glucido-protéides.

MÉTHODE DE PALMER, SMYTH ET MEYER (56). — La méthode d'Elson et Morgan a été modifiée par de nombreux chercheurs parce que le dosage de la glucosamine en présence de grandes quantités de protéides présente quelques difficultés.

(56) PALMER, SMYTH et MEYER. *Journ. biol. Chem.*, **119**, 1937, p. 491.

Nilsson (57) avait déjà décrit une méthode qui permet de doser la glucosamine, ajoutée à la caséine et au sérum, avec une erreur d'environ 10 p. 100.

Palmer, Smyth et Meyer, dans une série de travaux consacrés à l'étude des glucido-protéides, ont été conduits à préciser la technique de dosage. Ils ont d'abord constaté qu'aux dilutions utilisées par Elson et Morgan, puis par Nilsson, la coloration finale ne suit pas la loi de Beer-Lambert et ont défini ensuite les limites entre lesquelles devaient être comprises les dilutions des solutions à examiner.

De plus, ces auteurs ont déterminé avec soin les conditions d'hydrolyse permettant une libération totale de la glucosamine liée aux substances biologiques. Nilsson avait déjà montré qu'il était nécessaire de poursuivre pendant douze heures l'hydrolyse des mucines en présence de HCl 2N pour libérer quantitativement la glucosamine. Cependant dans son étude sur la teneur du sérum en glucosamine cet auteur, en dépit des constatations précédentes, hydrolyse le sérum pendant trois heures seulement. Palmer, Smyth et Meyer estiment que la durée de l'hydrolyse adoptée dans le cas du sérum est insuffisante et en la poursuivant plus loin, ils ont trouvé que le sérum a, en fait, une teneur en glucosamine deux fois supérieure à celle indiquée par Nilsson.

Ces auteurs mettent aussi en évidence l'importance considérable qu'il y a à utiliser des solutions fraîchement préparées d'acétylacétone ainsi que de l'alcool dépourvu de toute trace d'aldéhyde. Ils préconisent, enfin, de chauffer la solution après l'addition du réactif d'Ehrlich, afin d'activer le développement de la teinte finale.

II. — TECHNIQUE ADOPTÉE

POUR LE DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE DANS LE SÉRUM.

(Technique de Palmer, Smyth et Meyer.)

La technique que nous avons adoptée pour le dosage de la glucosamine dans le sérum et dans les différentes fractions que nous avons obtenues à partir du sérum est celle de Palmer,

(57) NILSSON. *Biochem. Z.*, 285, 1936, p. 386.

Smyth et Meyer. Nous avons suivi très fidèlement la technique proposée par ces auteurs. Cependant ne disposant pas du photomètre de Pulfrich, qui a été utilisé par ces derniers, nous avons employé, pour la comparaison des teintes finales, le comparateur photo-électrique Arca. Cet appareil, employé dans des conditions que nous avons définies, donne des résultats satisfaisants.

a) TECHNIQUE. — Dans une ampoule de 5 cent. cubes on introduit la substance à analyser, puis 1 cent. cube d'eau (*) et 1 cent. cube d'acide chlorhydrique approximativement 8 N. L'ampoule est fermée à la lampe et est maintenue dans un bain-marie bouillant pendant huit heures. Le contenu de l'ampoule est ensuite introduit dans une fiole jaugée de 25 cent. cubes. On rince l'ampoule à trois reprises, les eaux de rinçage sont versées dans la fiole jaugée. On complète avec de l'eau jusqu'au trait de jauge. On filtre afin d'éliminer les particules brunes, surtout abondantes quand la substance est riche en polyosides. On prélève 10 cent. cubes du filtrat que l'on titre avec de la soude 0,25 N en présence de rouge de méthyle. On transvase dans une fiole jaugée de 25 cent. cubes, 10 autres cent. cubes du filtrat que l'on neutralise avec 98 p. 100 de la quantité d'alcali exigée dans le titrage précédent. Au cours de la neutralisation, la fiole est agitée énergiquement. On complète jusqu'au trait de jauge.

On introduit dans 2 tubes à essais, d'une hauteur convenable, un volume de 4 cent. cubes de la solution précédente. On ajoute ensuite, dans l'un 2 cent. cubes de la solution fraîchement préparée d'acétylacétone, dans l'autre 2 cent. cubes de carbonate de sodium 0,50 N (essai à blanc). On place à l'intérieur des tubes à essais un tube à hémolyse, rempli de glace pilée, le bord évasé de ce dernier reposant sur le bord du tube à réaction et sa hauteur étant telle que l'espace compris entre la surface du liquide et le fond du tube à hémolyse soit d'environ 1 centimètre. Les tubes à essais sont ensuite plongés dans un bain-marie bouillant de façon que

(*) Dans le cas du sérum on introduit 1 cent. cube de sérum et 1 cent. cube d'acide chlorhydrique approximativement 8 N.

la solution soit entièrement immergée. La partie supérieure des tubes à essais, qui enveloppe le tube à hémolyse, est exposée à un léger courant d'air. Le tube à hémolyse fait fonction de réfrigérant, il sert à condenser et à ramener vers la solution les vapeurs d'acétylacétone. La solution est maintenue pendant exactement quinze minutes dans l'eau bouillante, puis les tubes sont refroidis par immersion dans l'eau froide. Les contenus sont dilués avec 10 cent. cubes d'alcool privé d'aldéhyde et 2 cent. cubes de réactif d'Ehrlich. On agite et on complète avec de l'alcool de façon à obtenir un volume final de 20 cent. cubes. Les tubes sont ensuite agités énergiquement et placés dans une étuve à 37° pendant trente minutes. Les solutions sont alors prêtes à être examinées au photo-comparateur.

La différence entre les lectures relatives aux deux solutions est proportionnelle à la teneur de la solution en glucosamine. Cependant, avec le photo-comparateur Arca que nous avons utilisé, il est nécessaire de déterminer, pour chaque expérience, la valeur du coefficient de proportionnalité. De sorte qu'il faut examiner, pour chaque expérience, en même temps que la solution provenant de la substance à analyser, deux solutions de titre connu de glucosamine. L'expérience se fera donc avec 5 tubes : 3 tubes renfermant les solutions à acétyler (1 provenant de la substance à analyser et 2 constituant les solutions standard) et 2 tubes pour les essais à blanc (1 pour la substance à analyser et 1 pour les solutions standard).

b) RÉACTIFS :

Acide chlorhydrique : environ 8 N ;

Soude : environ 0,25 N ;

Carbonate de sodium : 0,50 N ;

Solution d'acétylacétone : Cette solution est préparée immédiatement avant son emploi en dissolvant 0 c. c. 2 d'acétylacétone dans 10 cent. cubes de carbonate de sodium 0,5 N. L'acétylacétone, elle-même, est conservée à la glacière.

Réactif d'Ehrlich : Ce réactif est obtenu en dissolvant 0 gr. 8 de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde purifiée dans 30 cent. cubes d'alcool dépourvu d'aldéhyde. A cette solution on ajoute

30 cent. cubes d'acide chlorhydrique concentré. Ce réactif se conserve très longtemps à la glacière.

Alcool dépourvu d'aldéhyde : L'alcool absolu commercial est traité par un excès d'hydrate d'argent en présence de quelques gouttes de lessive de soude. On distille ensuite dans un appareil entièrement en verre (58).

p-diméthylaminobenzaldéhyde purifié : Les produits que l'on trouve dans le commerce sont de qualité très inégale. Aucun des échantillons que nous avons essayés n'a pu être employé directement. Bien plus, certains d'entre eux n'ont pas pu être purifiés, quelle qu'ait été la méthode suivie.

Dans ce travail nous avons adopté, à l'exclusion de tout autre, le produit livré par la maison « Hoffman Laroche ». Il se présente sous l'aspect d'une poudre cristalline jaune citron. L'élimination de l'impureté jaune a été faite en suivant la technique d'Adams (59). L'aldéhyde est dissous dans l'acide chlorhydrique dilué (acide chlorhydrique de $d^{20}_4 = 1,19$: 1 partie ; eau : 6 parties). La dissolution se fait lentement. Cette solution placée dans une éprouvette est diluée avec son volume d'eau, puis additionnée de lessive de soude à 20 p. 100. L'addition de la solution de soude se fait lentement tandis qu'on remue très énergiquement la liqueur. Les premières fractions du précipité sont fortement colorées, on les sépare par filtration. Le filtrat est de nouveau traité par la lessive de soude, le précipité qui apparaît alors est constitué par des flocons presque incolores. On arrête l'addition de soude avant que la précipitation ne soit complète car les dernières fractions sont également colorées. Ce précipité est desséché dans le vide. Il est à peine coloré en jaune. Les fractions de tête et de queue sont dissoutes dans la solution d'acide chlorhydrique et cette solution est à son tour soumise au fractionnement précédent. On retire ainsi une nouvelle quantité de produit peu coloré. Le réactif d'Ehrlich ainsi obtenu est légèrement jaune et laisse déposer au fond du flacon un faible précipité de chlorure de sodium.

c) MESURES PHOTO-ÉLECTRIQUES. — Le principe de l'appareil

(58) WINKLER. *Ber. chem. Ges.*, **38**, 1905, p. 3612.

(59) ADAMS. *Organic Synthesis*, vol. II, 1922, p. 12.

utilisé est basé sur l'emploi de deux cellules photo-électriques en opposition.

Nous ne nous proposons pas de faire ici la description du comparateur photo-électrique Arca (*). Nous préciserons cependant le mode d'emploi de l'appareil en insistant sur certains points particuliers au dosage de la glucosamine.

On commence par régler, au moyen d'un rhéostat, la tension d'alimentation de la lampe. La tension optimum est de 3,5 V (pour des valeurs plus élevées, le courant débité par le couple des cellules n'est pas stable et les variations observées sont importantes). Les diaphragmes étant alors complètement ouverts et les lentilles étant fixées dans la position qui correspond à leur écartement maximum, on place la lampe au centre de l'appareil, c'est-à-dire dans une position pour laquelle le courant débité par le couple est sensiblement nul. Ces opérations de réglage sont faites une fois pour toutes. Il suffit, avant chaque dosage, d'achever la mise au point en remplissant la cuve d'eau distillée et en réglant l'ouverture, d'un des diaphragmes de façon à annuler exactement l'intensité du courant. Dans ces conditions, l'aiguille de l'ampèremètre est au zéro. Au cours des dosages, on pourra vérifier que la position d'aucun des éléments n'a changé. Il suffira, à cet effet, de constater que l'aiguille de l'ampèremètre est au zéro quand la cuve est à nouveau remplie d'eau distillée. La détermination du zéro et toutes les lectures sont faites en utilisant la sensibilité maximum. Entre chaque lecture, il faut avoir soin de remonter la barre qui actionne les volets pour ne pas fatiguer inutilement les cellules.

Les teintes finales étant relativement faibles, il est nécessaire d'employer des cuves de longueur maximum (4 centimètres).

Nous insistons, enfin, sur le fait que le dégagement de gaz carbonique, qui a lieu quand le liquide est versé dans la cuve, modifie d'une façon notable l'épaisseur du liquide examiné. Les lectures doivent donc être faites au bout de quelques secondes, après que le dégagement du gaz carbonique ait

(*) Comparateur Photo-Electrique Arca, modèle Chovin-Leroy, Société française des Régulateurs universels Arca, Paris.

cessé. A ce moment, d'ailleurs, l'aiguille de l'ampèremètre a atteint sa position définitive.

Ajoutons que, dans la zone de concentration utilisée, l'intensité des teintes finales obéit à la loi de Beer-Lambert, comme le montre la figure 44 de la page 74. De plus, nous avons vérifié qu'on obtient les mêmes résultats si au lieu d'opérer en lumière verte, comme le proposent de nombreux auteurs, on utilise la lumière blanche.

B. — Dosage de l'acide acétique et de la glucosamine dans le sérum et dans différentes fractions sériques.

I. — ETUDE DU SÉROMUCOÏDE.

PRÉPARATION DU SÉROMUCOÏDE. — Le principe de la séparation du séromucoïde est basé sur les propriétés physico-chimiques de ce protéide très différentes de celles de la sérum-albumine et de la sérumglobuline, et en particulier sur le fait que ce glucido-protéide n'est pas coagulable par la chaleur.

La technique que nous avons suivie est sensiblement voisine de celle proposée par Zanetti et adoptée, après quelques modifications, par Bywaters (60).

A un volume de 4.750 cent. cubes de sérum de cheval, étendu de deux fois son volume d'eau distillée, on ajoute la quantité d'acide sulfurique dilué nécessaire pour obtenir une réaction très légèrement acide au tournesol. La solution est ensuite maintenue dans un bain-marie bouillant pendant environ vingt minutes. Les albumines et les globulines coagulent. On filtre sur un filtre à plis. Les grumeaux restés sur le filtre sont pressés et les liquides sont réunis. On obtient ainsi une liqueur fortement opalescente qu'on concentre à faible volume par ébullition dans le vide. On sépare une première fois le séromucoïde par précipitation au moyen de l'alcool et centrifugation. L'addition de l'alcool se fait par fractions successives jusqu'à précipitation complète du glucido-protéide.

(60) BYWATERS. *Biochem. Z.*, **45**, 1909, p. 322.

Le culot, qui est fortement coloré, est dissous dans 200 cent. cubes d'eau et la solution obtenue est à nouveau traitée par l'alcool et centrifugée. Ce traitement est renouvelé à quatre reprises. Le culot final, qui reste encore faiblement coloré, est alors dissous dans de l'eau distillée et la solution est soumise

TABLEAU XVI.

	S ₁	S ₂	S ₃	A	B
Volume d'hydrolysât (ou de solution standard) acétylé	4 c. c.	4 c. c.	4 c. c.	4 c. c.	2 c. c.
Déviation propres à la glucosamine (voir fig. 11)	19	26	61	40,5	24
ClH glucosamine contenu dans 1 c. c. de la solution standard ou d'hydrolysât soumis à l'acétylation (voir fig. 11)	$\frac{8}{1.000}$ mg	$\frac{12}{1.000}$ mg.	$\frac{32}{1.000}$ mg.	$\frac{20.4}{1.000}$ mg.	$\frac{21,6}{1.000}$ mg.
ClH glucosamine calculé pour 1 gr. de substance :					
a) exprimé en milligrammes . .				67,10	71,05
b) exprimé en cent. cubes de N/20.				6,22	6,59
$R = \frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$				1,3	1,2

S₁, S₂ et S₃ sont les solutions standard.
 La solution soumise à l'acétylation provient de l'hydrolyse de 19 milligrammes de substance. Elle a été obtenue de la façon qui a été indiquée lors de la description de la technique de dosage (voir p. 66).
 Dans l'expérience B aux 2 cent. cubes d'hydrolysât on a ajouté 2 cent. cubes d'eau distillée. Nous avons fait cette seconde mesure afin de connaître la précision de la méthode; on voit que l'écart entre les résultats des deux mesures A et B est d'environ 6 p. 100.

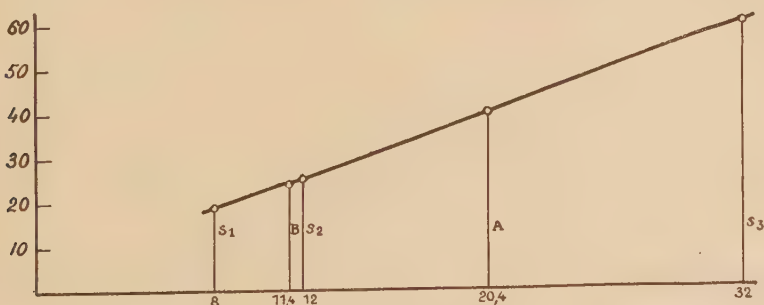


FIG. 11. — Dosage de la glucosamine dans le sérumuçoïde : mesures colorimétriques.

Les valeurs portées en ordonnées représentent le nombre de graduations dont a dévié l'aiguille de l'ampèremètre du fait de la teinte développée par la glucosamine et celles portées en abscisse, le poids (exprimé en millièmes de milligramme) de ClH glucosamine contenu dans 1 cent. cube de solutions standard et des hydrolysats soumis à l'acétylation.

à la dialyse. La dialyse se fait à la glacière, contre de l'eau distillée et en présence de toluène, elle est poursuivie pendant quatre jours. On précipite la solution dialysée, par addition de trois fois son volume d'alcool absolu et on centrifuge. Le culot est desséché dans le vide phosphorique jusqu'à poids constant. Après pulvérisation, on obtient une poudre très légère, de couleur jaune paille. Le poids de la substance ainsi obtenue est de 1 gr. 340. La teneur de 1 litre de sérum en séromucoïde est donc de 0 gr. 77. On sait que les auteurs ont trouvé des valeurs comprises entre 0 gr. 2 à 0 gr. 9 par litre de sérum.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE LIÉ AU SÉROMUCOÏDE. — Le dosage a été effectué sur 0 gr. 6395 de la substance obtenue suivant la méthode qui vient d'être décrite (*). Les conditions d'hydrolyse de l'acide acétique fixé et de destruction des acides volatils secondaires sont celles qui ont été décrites au début de ce travail. Nous avons trouvé que la prise d'essai renferme 5 c. c. 30 d'acide acétique N/20, soit pour 1 gramme de la substance : 8 c. c. 28 d'acide acétique N/20.

En résumé, comme l'avait entrevu Zannetti, le séromucoïde est acétylé. Cependant l'acide acétique lié à ce glucido-protéide ne constitue qu'une fraction très faible de la totalité de l'acide acétique sérique. En effet, les quantités d'acide acétique libéré par 1 litre de sérum et par le séromucoïde contenu dans le même volume de sérum correspondent respectivement à 12 cent. cubes et à 0 c. c. 30 d'acide N. Nous devons donc rechercher dans les fractions globuliniques et albuminiques la source principale de l'acide acétique sérique.

De plus, nous avons déterminé la teneur en glucosamine de la même préparation (voir tableau XVI et fig. 41) et nous avons calculé le rapport moléculaire $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$. Les valeurs obtenues pour ce rapport sont de 1,2 et 1,3, donc assez proches de l'unité.

(*) Il est possible qu'au cours de l'isolement du séromucoïde une très faible partie de l'acide acétique qu'il renferme ait été hydrolysé. Il est également possible que parmi les impuretés que retient énergiquement la substance se trouvent des produits plus ou moins acétylés.

II. — DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE
DANS LES GLOBULINES ET LES ALBUMINES.

OBTENTION DES GLOBULINES ET DES ALBUMINES (61). — Les globulines sont précipitées par addition au sérum d'un volume égal de solution saturée et parfaitement neutre de sulfate d'ammonium purifié, puis séparées par centrifugation. Le culot est ensuite redissous dans le plus petit volume d'eau possible et les globulines sont à nouveau précipitées par addition d'un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium égal au volume de l'eau employée pour la redissolution. On centrifuge à nouveau. Le culot est mis en solution dans l'eau. Cette solution renferme la totalité des globulines. Les liqueurs surnageant les culots sont réunies. Cette solution contient l'ensemble des albumines. Les solutions des globulines et des albumines sont dialysées puis traitées comme il a été indiqué pour le dosage de l'acide acétique.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE. — Nous avons trouvé que 1 gramme de globulines contient 3 c. c. 12 d'acide acétique N/20 et que 1 gramme d'albumines (*) en contient 3 c. c. 54.

Ainsi les globulines et les albumines ont des teneurs en acide acétique assez voisines. Elles constituent de plus la source principale de l'acide acétique sérique. Il est possible que l'acide acétique ne se trouve pas distribué d'une façon homogène dans les différentes fractions qui constituent les mélanges complexes que sont les albumines et les globulines. Aussi il nous a paru intéressant de déterminer la teneur en acide acétique de quelques-unes de ces fractions. Le fractionnement n'a porté que sur les albumines qui sont les protéides sériques les mieux connus.

(61) MACHEBOEUF. *Thèse*, 1928, p. 18.

(*) Les concentrations des solutions ont été déterminées à partir de l'extrait sec à 110°.

III. — DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE DANS L'ALBUMINE CRISTALLISÉE.

PRÉPARATION DE L'ALBUMINE CRISTALLISÉE DU SÉRUM. — La méthode utilisée est celle déjà adoptée par différents auteurs (62) à la suite des travaux de Hofmeister (63), Hopkins et Pinkus (64), Soerensen et Höyrup (65).

Le principe de la méthode est basé sur le fait que les solutions d'albumines sériques demi-saturées en sulfate d'ammonium et amenées à un pH de 4,8 cristallisent pourvu que certaines conditions physiques soient réalisées.

A un volume déterminé de sérum de cheval, on ajoute un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium (*). Les globulines précipitent. On laisse reposer. On centrifuge. On recueille la solution surnageante. Sur une partie aliquote de cette solution on détermine par une mesure potentiométrique la quantité d'acide sulfurique N nécessaire pour amener la solution à pH 4,8. Afin d'amener très exactement la solution au pH convenable, l'addition de l'acide sulfurique a été faite en deux temps. Une première fois nous avons ajouté une quantité d'acide sulfurique N légèrement inférieure à la quantité calculée. Nous avons ensuite, par une nouvelle détermination potentiométrique, déterminé la quantité d'acide sulfurique N/5 nécessaire pour ajuster la solution à pH 4,8. Les additions d'acide se font toujours par petites fractions et en ayant soin d'agiter énergiquement la solution au cours de cette opération. La solution est abandonnée pendant vingt-quatre heures à la température du laboratoire puis décantée et centrifugée.

Le culot est dissous dans 80 cent. cubes d'eau distillée, la solution est filtrée. Au filtrat on ajoute 80 cent. cubes de solution saturée de sulfate d'ammonium puis, par petites fractions, de l'acide sulfurique dilué jusqu'à formation d'un

(62) SANDOR. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **18**, 1936, p. 877. — PÉREZ. Contribution à l'étude de la solubilité des protéides, *Thèse doctorat ès sciences*, Paris, 1939.

(63) HOFMEISTER. *Zeitschr. physiol. Chem.*, **14**, 1890, p. 165.

(64) HOPKINS et PINKUS. *Journ. Physiol.*, **23**, 1891, p. 130.

(65) SOERENSEN et HÖYRUP. *C. R. Lab. Carlsberg*, **12**, 1915-1917, p. 164.

(*) Le sulfate d'ammonium utilisé est le sulfate d'ammonium pur.

trouble léger qui marque le début de la cristallisation. On abandonne de nouveau la solution pendant vingt-quatre heures à la température du laboratoire, on décante et centrifuge.

Les mêmes opérations sont répétées cinq fois encore. Le dernier culot de centrifugation qui représente de l'albumine qui a été cristallisée sept fois est dissous dans l'eau et la solution est dialysée pendant quatre jours à la glacière, contre de l'eau distillée en présence de quelques gouttes de toluène. La solution dialysée est limpide, presque incolore, 15 cent. cubes de la solution renferment 0 gr. 2190 de protéides deséchés à 110°.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE. — Le dosage de l'acide acétique a été effectué sur l'extrait sec provenant de l'évaporation au bain-marie de 20 cent. cubes de la solution précédente, soit sur 0 gr. 2920 de protéide. La technique du dosage est celle qui a été décrite au début de ce travail. La prise d'essai a libéré 0 c. c. 10 d'acide acétique N/20, soit pour 1 gramme d'albumine cristallisée 0 c. c. 34 d'acide acétique N/20. Un dosage à blanc nous avait préalablement montré que la solution d'albumine ne renfermait pas de trace d'acides entraînaibles par la vapeur d'eau.

Puisque la teneur en acide acétique (exprimé en centimètres cubes N/20) de 1 gramme d'albumine du sérum de cheval est de 3 c. c. 51 (voir page 73), l'albumine cristallisée, obtenue de la façon qui vient d'être décrite, ne renferme que le 1/10 environ de l'acide acétique fixé sur l'albumine brute. L'acide acétique est donc fixé principalement sur les fractions albuminiques plus solubles qui ont été éliminées au cours des cristallisations successives.

Nous savons d'autre part, depuis les travaux de Hewitt (voir partie historique), que l'albumine cristallisable est la fraction des protéides sériques la moins riche en osides. Cette relation entre la teneur en osides, et donc en glucosamine des différentes fractions protéidiques du sérum, et les quantités d'acide acétique qu'elles libèrent sera précisée dans les expériences que nous allons décrire dans les chapitres qui suivent.

IV. — DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE ET DE LA GLUCOSAMINE
DANS QUELQUES FRACTIONS DE LA SÉRUMALBUMINE.

$$\left(\text{Détermination du rapport } \frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}} \right)$$

FRACTIONNEMENT DE LA SÉRUMALBUMINE. — Les différentes fractions qui font l'objet de cette étude ont été obtenues en suivant une technique sensiblement voisine de celle utilisée par Leslie Frank Hewitt dans un travail relatif au fractionnement de la sérumalbumine (66).

Un volume de 1.650 cent. cubes de sérum normal de cheval est dilué par addition d'un volume égal d'eau distillée. Au sérum ainsi dilué on ajoute un volume égal de la solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium. Dans ces conditions les globulines précipitent et sont séparées de la solution d'albumine par filtration. Le fractionnement a porté uniquement sur cette dernière solution.

Au filtrat parfaitement clair et dont le volume final est de 5.480 cent. cubes on ajoute 8 c. c. 7 d'acide acétique glacial. L'acide est ajouté par petites fractions pendant que le liquide est agité énergiquement. La cristallisation s'amorce lentement et se poursuit une nuit à la température du laboratoire. Après décantation et centrifugation on sépare le liquide surnageant du précipité cristallin (A_1). La fraction (A_1) est traitée par 540 cent. cubes d'eau distillée. Après quelques instants on centrifuge et on décante. Le liquide surnageant est clair, limpide et légèrement jaunâtre, son volume est de 515 cent. cubes. A cette liqueur on ajoute 30 cent. cubes de la solution saturée de sulfate d'ammonium. Cette addition est faite par petites fractions tandis qu'on agite fortement le liquide en frottant au moyen d'un agitateur la paroi interne de l'éprouvette dans laquelle se fait la cristallisation. Après centrifugation on sépare le précipité cristallin (A_2). La fraction (A_2) est dissoute dans 162 cent. cubes d'eau, à cette solution on ajoute, en prenant les précautions signalées plus haut, 89 cent. cubes de la solution de sulfate d'ammonium. La cristallisa-

(66) LESLIE FRANK HEWITT. *Biochem. Journ.*, **30**, 1936, p. 2229.

tion se déclenche assez rapidement, on décante et on centrifuge. Le précipité est blanc ; examiné au microscope il se présente sous une forme cristalline. Ce précipité est dissous dans l'eau et la solution est soumise à la dialyse contre l'eau courante en présence de toluène. On obtient finalement 220 cent. cubes d'une solution limpide et incolore : 10 cent. cubes de cette solution contiennent 0 gr. 2940 de protéides desséchés à 110°. Cette fraction constitue la fraction (A₃).

Au liquide surnageant le précipité (A₁) et dont le volume est de 5.250 cent. cubes on ajoute 1.082 cent. cubes de la solution saturée de sulfate d'ammonium et 5 c. c. 4 d'acide acétique glacial. Il se forme un précipité, on laisse déposer quelques heures, on décante et on centrifuge. Le culot est traité par 240 cent. cubes d'eau distillée, une partie du précipité reste insoluble. On centrifuge, le culot est rejeté, le liquide surnageant est soumis à la dialyse pendant trois jours contre l'eau courante en présence de toluène. On obtient ainsi 250 cent. cubes d'une solution très opalescente : 10 cent. cubes de cette solution contiennent 0 gr. 1726 de protéides desséchés à 110°. Cette fraction constitue la fraction B.

Au liquide surnageant le précipité (A₂) et dont le volume est de 740 cent. cubes, on ajoute 270 cent. cubes de la solution saturée de sulfate d'ammonium et 2 c. c. 7 d'acide acétique glacial : il se forme un précipité qu'on laisse déposer quelques heures. Puis on décante et on centrifuge. On dissout entièrement le culot dans l'eau distillée. Après dialyse on obtient 170 cent. cubes d'une solution limpide, teintée assez fortement en jaune : 10 cent. cubes de cette solution contiennent 0 gr. 6400 de protéides desséchés à 110°. Cette fraction constitue la fraction C.

Nous avons dosé dans chacune de ces trois fractions l'acide acétique et la glucosamine qu'elles renferment. Les résultats sont reproduits dans les tableaux qui suivent.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE.

TABEAU XVII.

FRACTIONS	A ₃	C	B
Poids de l'échantillon analysé, (en grammes).	0,882	0,640	0,517
Acide acétique N/20 trouvé (en centimètres cubes). .	0,29	0,60	2,32
Acide acétique N/20 calculé pour 1 gramme de protéide (en centimètres cubes).	0,33	0,93	4,48

DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE ET CALCUL DES RAPPORTS MOLÉCULAIRES $\frac{\text{ACIDE ACÉTIQUE.}}{\text{GLUCOSAMINE}}$

TABEAU XVIII.

FRACTIONS	S ₁	S ₂	A ₃	C	B
Poids de l'échantillon soumis à l'hydrolyse			0,294 gr.	0,320 gr.	0,0863 gr.
Volume d'hydrolysate (ou de solution standard) acétylé.	4 c. c.	4 c. c.	4 c. c.	2 c. c.	2 c. c.
Déviati on propres à la glucosamine (voir fig. 12).	21	56	22	28	35
ClH glucosamine contenu dans 1 cent. cube de l'hydrolysate (ou de solution standard) soumis à l'acétylation (voir fig. 12) . .	$\frac{8}{1.000}$ mg.	$\frac{32}{1.000}$ mg.	$\frac{8.6}{1.000}$ mg.	$\frac{2 \times 12.6}{1.000}$ mg.	$\frac{2 \times 17}{1.000}$ mg.
ClH glucosamine calculé pour 1 gr. de protéine :					
a) exprimé en milligrammes.			1,8	4,9	24,6
b) exprimé en cent. cubes de N/20			0,17	0,43	2,28
R = $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$			1,94	2,06	1,96

S₁ et S₂ sont les deux solutions standard choisies dans ce dosage.
 Dans les dosages C et B aux 2 cent. cubes de l'hydrolysate ou a ajouté 2 cent. cubes d'eau distillée.

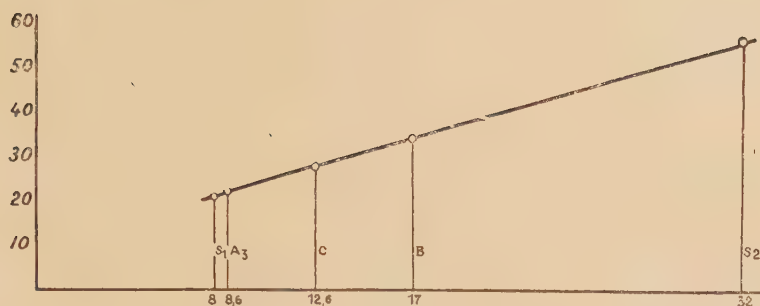


FIG. 12. — Dosage de la glucosamine dans quelques fractions de la sérum-albumine : mesures colorimétriques. Pour les valeurs des coordonnées voir fig. 11.

En résumé, les fractions albuminiques sont d'autant plus riches en acide acétique qu'elles sont plus riches en glucosamine et qu'elles sont plus solubles. Ainsi l'acide acétique provenant des albumines doit être lié aux osides albuminiques. De plus, dans ces fractions, le rapport entre l'acide acétique et la glucosamine est très voisin de 2.

V. — DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE DANS DIFFÉRENTS SÉRUMS.

$$\left(\text{Détermination du rapport } \frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}} \right)$$

Les mesures qui suivent ont été faites sur les échantillons de sérums dialysés dont on a déterminé les teneurs en acide acétique dans la première partie de cette étude (voir page 38).

TABLEAU XIX.

SÉRUM DIALYSÉ (OU SOLUTION STANDARD)								CHEVAL antidiphitérique ($\Delta\lambda$)	CHEVAL normal ($\Delta\lambda$)		
	S III	S II	S I	HOMME (II)						MOUTON (λ_2)	MOUTON (λ_1)
Déviatiou propre à la glucosamine (voir fig. 43)	I 38 II 53	24,5 30	46 48,5	29 38	25 30	24,5 31,5	25 34			46 48	19
Teneur en ClII glucosamine de 1 cent. cube de l'hydrolysât (ou de la solution standard) soumis à l'acétylation (voir fig. 43).	I II	20	40	26,6 26,5	21,8 20,0	20,8 20,8	21,8 23,2	10,0 10,0			
(exprimée en millèmes de milligramme)											
Teneur en ClII glucosamine de 40 cent. cubes de sérum dialysé :											
<i>a</i> , exprimée en milligrammes	I II			46,625 46,625	43,625 12,500	43,000 13,000	43,625 14,500	6,250 6,250			6,625
<i>b</i> , exprimée en centimètres cubes de solution N/20. }	I II			1,54 1,54	4,26 4,46	4,20 4,20	4,26 4,34	0,38 0,38			0,61
Teneur en CH ³ CO ² H N/20 de 40 cent. cubes de sérum dialysé											
$R = \frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$	I II			2,48 4,61	2,63 2,08	2,24 4,86	2,33 4,84	0,99 1,73			1,44 1,86

Le volume de sérum hydrolysé est de 4 cent. cube.
 Les volumes des hydrolysats sériques dilués et neutralisés et des solutions standard soumis à l'acétylation par l'acétylène sont les mêmes dans tous les dosages (5 cent. cubes).
 Les mesures colorimétriques ont été réalisées à la fois avec l'appareil Arca et l'électrophotomètre de Meunier (1). Les résultats obtenus avec l'appareil Arca sont représentés dans les rangées horizontales (I) et ceux obtenus avec l'appareil de Meunier dans les rangées horizontales [II] (2).

(1) Pour la description de l'appareil voir Meunier, *Bull. Soc. Chim. B.*, **19**, 1937, p. 411.
 (2) On peut voir d'après cette série de mesures que les deux appareils se comportent d'une façon également satisfaisante.

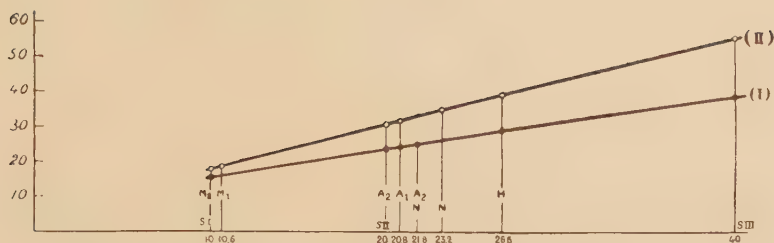


FIG. 13. — Dosage de la glucosamine dans différents sérums :
mesures colorimétriques.

La droite (II) correspond aux mesures faites avec l'électrophotomètre de Meunier, la droite (I) aux mesures réalisées avec l'appareil Arca. Pour les valeurs des coordonnées voir figure 11, sauf pour les valeurs des ordonnées relatives à la droite (II) qui représentent le nombre de déviations dont il a fallu tourner le tambour pour ramener le spot du galvanomètre au zéro.

En résumé, les sérums ont des teneurs en glucosamine différentes, par contre les valeurs de leurs rapports moléculaires $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ sont assez voisines. La valeur moyenne de ces rapports est de 1,87.

RÉSUMÉ ET DISCUSSION

Dans un travail précédent (1) nous avons montré l'existence de radicaux acétyles fixés sur les protéides du sérum de cheval. Dans la présente étude, nous nous sommes appliqué à mettre au point la technique de dosage de l'acide acétique lié aux protéides sériques et à définir la nature des groupements acétylés contenus dans les protéides du sérum de cheval.

Dans la première partie de notre étude nous avons montré que les techniques de dosage de l'acide acétique lié aux substances biologiques, telles qu'elles ont été proposées par différents auteurs, sont de valeurs très inégales. Nous avons pu montrer en particulier que, parmi les agents d'hydrolyse utilisés, seul l'acide paratoluènesulfonique pouvait intervenir dans une technique exacte de dosage de l'acide acétique, fixé sur les protéides. En effet, d'une part, la quantité d'acides volatils qui proviennent de réactions secondaires et qui souillent les distillats est faible après hydrolyse du sérum par l'acide paratoluènesulfonique ; d'autre part, la totalité de ces acides est détruite après traitement des distillats par l'oxyde rouge de mercure (méthode de Friedermann). Ces conclusions sont à la base de la technique de dosage qui a été utilisée dans ce travail et que nous avons décrite.

Nous avons vérifié, ensuite, que la totalité de l'acide volatil fixé sur les protéides du sérum de cheval était constituée par de l'acide acétique. En effet, les courbes d'entraînement fractionné par la vapeur d'eau (méthode de Duclaux), le coefficient de partage entre l'eau et l'éther, et le poids des cendres du sel d'argent, obtenus à partir du distillat, correspondent,

aux erreurs expérimentales près, à ceux des solutions d'acide acétique pur.

Nous avons déterminé aussi la teneur en acide acétique lié de différents échantillons de sérum. Celle-ci varie selon les espèces animales.

On a tenté de résoudre le problème relatif à la nature de la liaison de l'acide acétique avec le reste de la molécule protéidique en faisant appel à la fois à des méthodes physico-chimiques et à l'analyse chimique. Les résultats obtenus par l'une et l'autre méthode sont concordants.

Les courbes d'hydrolyse du sérum étudiées dans la deuxième partie de ce travail, aussi bien celles obtenues en milieu acide à 100° que celles obtenues en milieu alcalin à 100° et à 31° présentent une inflexion remarquable. De plus, l'inflexion qui caractérise les courbes précédentes a lieu pour une valeur de l'ordonnée voisine de $\frac{c}{c_{\infty}} = 0,5$, c'est-à-dire quand la moitié environ des radicaux acétyles du sérum a été hydrolysée.

L'allure particulière des courbes d'hydrolyse du sérum et la comparaison de ces dernières avec les courbes d'hydrolyse de différents composés acétylés dont nous avons fait la synthèse rendent vraisemblables les hypothèses suivantes :

1° Le sérum renferme deux types de groupements acétylés dont les vitesses relatives d'hydrolyse sont très différentes.

2° Ceux-ci existent en quantité sensiblement équivalente.

3° Les radicaux acétylés ne sont fixés ni sur des fonctions alcools, ni sur des fonctions thiols des protéides sériques mais sur des fonctions amines. Le groupement acétylé dont la durée d'hydrolyse est la plus courte serait l'acétamide de la glucosamine. La nature exacte du second groupement n'a pas pu être déterminée.

Ces hypothèses sont confirmées par les résultats de l'analyse chimique. En effet, nous avons montré dans la troisième partie de cette étude :

1° Qu'il existe un parallélisme entre les teneurs en acide acétique et en glucosamine des sérums et des différentes frac-

tions sériques étudiés. Ce résultat est un nouvel argument en faveur de l'existence dans le sérum d'une N-acétylglucosamine liée aux protéides.

2° Que les rapports moléculaires $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ sont, dans tous les cas, supérieurs à 1. Ainsi une partie de l'acide acétique sérique est fixée sur une autre fonction que la fonction amine de la glucosamine. Ce fait rend encore plus probable l'existence dans le sérum de deux types de groupements acétylés.

3° Que la valeur moyenne des rapports moléculaires $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ est de 1,96 pour les fractions albuminiques et de 1,87 pour les sérums. Ainsi le second constituant acétylé serait, dans le sérum, en proportion légèrement inférieure à celle de la glucosamine et dans les fractions albuminiques étudiées, en quantité équivalente. Ces résultats prouveraient, en outre, que la substance acétylée non déterminée participe, avec la glucosamine, au complexe osidique des albumines et des globulines.

En outre, nous avons trouvé pour le séromucoïde un rapport moléculaire $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ dont la valeur est de 1,2. Comme il est probable que l'échantillon de séromucoïde que nous avons obtenu renferme encore de faibles quantités de glucides albuminiques, on peut admettre que la valeur réelle du rapport moléculaire $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ du séromucoïde est plus faible que celle trouvée et qu'elle est très probablement de 1. Dans cette hypothèse, le séromucoïde ne renfermerait qu'un seul radical acétyle par reste de glucosamine, contrairement aux autres protéides sériques qui en renferment deux.

De plus, du fait que les glucides albuminiques et globuliniques constituent la presque totalité des glucides sériques (le séromucoïde n'existant qu'en très faible quantité dans le sérum) la valeur du rapport moléculaire $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ du sérum doit être voisine de 2, tout en lui étant inférieure. La valeur que nous avons trouvée ($R = 1,87$) est donc

conforme à l'hypothèse de l'existence dans le sérum de faibles quantités de séromucoïde pour lequel la valeur du rapport moléculaire $\frac{\text{acide acétique}}{\text{glucosamine}}$ serait de 1.

En résumé, l'acide acétique, que l'on peut libérer du sérum de cheval— celui-ci en renferme 0 gr. 72 par litre — se trouverait fixé pour moitié environ sur la fonction amine de la glucosamine du séromucoïde et des protéïdes albuminiques et globuliniques et pour moitié sur un autre constituant de ces protéïdes et vraisemblablement sur une fonction amine de ce constituant. La nature exacte de ce constituant est encore inconnue, il est cependant permis de penser qu'il participe au complexe osidique des globulines et des albumines sériques.

Ainsi l'oside de la sérumalbumine et de la sérumglobuline présenterait une grande analogie avec celui de l'ovalbumine. En effet Neuberger (67) a montré qu'il existe dans ce dernier, à côté de la glucosamine, un autre constituant aminé non encore déterminé.

Ajoutons, enfin, que la technique utilisée par Neuberger dans l'étude de l'oside de l'ovalbumine n'a pas permis de savoir si les fonctions amines sont acétylées dans l'oside naturel, de même que les techniques utilisées par les auteurs qui ont étudié l'oside de la sérumalbumine et de la sérumglobuline n'ont pas pu permettre d'établir — ou même ont conduit à nier (voir page 12) — l'existence de radicaux acétyles dans cet oside.

(67) NEUBERGER. *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 1435.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Applications de l'électrophorèse à l'analyse
sérologique et bactériologique.**

VU ET APPROUVÉ LE 2 JUILLET 1941 :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

*Le Doyen de la Faculté des Sciences
chargé des fonctions de
Recteur de l'Académie de Paris,*

CH. MAURAIN

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	4

PREMIERE PARTIE

A. Exposé de quelques techniques de dosage des acides volatils liés aux substances biologiques	14
B. Etude critique des techniques de dosage des acides volatils fixés sur les substances biologiques	22
C. Technique proposée pour le dosage de l'acide acétique lié aux protéides sériques	29
D. Caractérisation de l'acide volatil lié aux protéides sériques ..	34
E. Teneur de quelques sérums en acide acétique	37
F. Conclusions	37

DEUXIEME PARTIE

A. Etude des courbes d'hydrolyse du sérum	40
B. Etude des courbes d'hydrolyse de quelques substances biologi ques acétylées	46
C. Etude comparative des courbes d'hydrolyse du sérum et des composés précédemment étudiés	58

TROISIEME PARTIE

A. Technique de dosage de la glucosamine	61
B. Dosage de l'acide acétique et de la glucosamine dans le sérum et dans différentes fractions sériques	70
RÉSUMÉ et DISCUSSION	82
